

(Aus dem Zoologischen Institut Gießen.)

## DOPPELBRECHUNG DER KERNSPINDEL UND ZUGFASERTHEORIE DER CHROMOSOMENBEWEGUNG.

Von

W. J. SCHMIDT.

Mit 10 Textabbildungen (24 Einzelbildern).

(Eingegangen am 7. September 1939.)

### Inhaltsübersicht.

	Seite
Einleitung . . . . .	253
I. Die Doppelbrechung der Kernspindel im Ei von <i>Cerebratulus lacteus</i> . . . . .	256
II. Die Doppelbrechung der Kernspindel im Ei von <i>Psammechinus miliaris</i> . . . . .	260
Zusammenfassung . . . . .	264

### Einleitung.

Bei der Untersuchung des *lebenden*, sich furchenden Eies von *Psammechinus miliaris*<sup>1</sup> hatte ich unter anderem die *Doppelbrechung des Spindelapparates* nachgewiesen: Insbesondere wirken die Polstrahlen positiv in bezug auf die Länge, so daß jeder Spindelpol als Ganzes die Erscheinung eines sogenannten „positiven Kreuzes“ darbietet. Einzelne Strahlen ließen sich aufleuchtend im dunklen Sehfeld des Polarisationsmikroskops weithin im Plasma verfolgen. Da nun das Spindelmaterial ohne Zweifel wesentlich aus Eiweißstoffen besteht und Proteinmolekeln ganz allgemein positiv in bezug auf die Länge wirken, ist die Doppelbrechung der bündige Beweis, daß hier Parallelisierung der Molekeln, *Faserstruktur*, vorliegt.

Dabei mag man sich vorstellen, daß bei der Bildung des achromatischen Apparates im Cytoplasma bereits fertig vorliegende Proteinmolekeln geordnet werden, oder aber — was mit dem allmählichen Auswachsen der Fibrillen vielleicht besser vereinbar —, daß die Strahlen durch Kondensation (Polymerisation) von Aminosäuren neu aufgebaut und mehr und mehr verlängert werden. Bei intranucleären Spindeln geht das faserbildende Material aus Proteinen des Kernes (vielleicht des „Kernsaftes“) hervor. Die Leistung des Centriols — das bekanntlich nicht stets vorhanden ist — dürfte bei diesem Vorgang wohl nur zweiten Ranges sein, indem es gewissermaßen ein Kristallisationszentrum für die Fibrillenbildung darstellt, vielleicht auch den Katalysator liefert, welcher die Kondensation in die Wege leitet, ähnlich wie die Fibrinfasern gern an die Blutplättchen ansetzen, aus denen die Thrombokinasen entweichen, welche

<sup>1</sup> SCHMIDT, W. J.: Doppelbrechung von Chromosomen und Kernspindel und ihre Bedeutung für das kausale Verständnis der Mitose. Arch. exper. Zellforsch. 19, 352—360 (1937). — Vgl. auch Ber. oberhess. Ges. Natur- u. Heilk. zu Gießen, Naturwiss. Abt. 17, 140—144 (1936). — Biodynamica 1936, 1—5.

die Umwandlung des in der Blutflüssigkeit enthaltenen Fibrinogens zu Fibrin in Gang setzt. Es dürfte sich also bei der Entstehung des Spindelapparates im Grunde um den gleichen Vorgang handeln, der zur Bildung von Myofibrillen, kollagenen Fasern, Fibrinfäden usw. führt, und der sich in den beiden letzten Fällen auch im Reagenzglas abspielen kann.

Nun war schon gelegentlich von anderen Autoren und mir beobachtet worden<sup>1</sup>, daß die positive Doppelbrechung des Spindelapparates auch in *Dauerpräparaten* zu beobachten ist, eine Feststellung, die nach verschiedener Richtung hin Bedeutung hat.

Zunächst lehrt sie, daß *regelrechte Fixierung keine grundlegende Änderung im Feinbau des Spindelapparates hervorruft*; denn eine solche müßte in der Doppelbrechung irgendwie zum Vorschein kommen. Die manchmal geäußerte Meinung, die in Dauerpräparaten sichtbare Faserstruktur des Spindelapparates sei ein Fixierungsartefakt, besteht in solcher Allgemeinheit sicher nicht zu Recht. Auch gehören gerade fibrilläre Bildungen zu denen, die, von groben Eingriffen abgesehen, am *wenigsten* verändert werden: bei ihnen kann es sich bei der Fixierung nur um Quellung und Entquellung, Einschalten oder Herausnehmen von Wasser zwischen die Proteinmolekeln handeln, was sich in Vergrößerung oder Verkleinerung des Fibrillenquerschnittes ausspricht, die allgemeine Gestalt der Fibrille aber unangetastet läßt. So befestigt die Erhaltung der Doppelbrechung des Spindelapparates im fixierten Präparat wesentlich das Vertrauen zu diesem.

Dann aber spricht die deutliche Erhaltung der Doppelbrechung in einem Medium mit so hoher Brechzahl wie Balsam ( $n_D = 1,54$ ) dafür, daß nicht nur *Formdoppelbrechung* vorliegt als Ausdruck der Parallelisierung der Fadenmolekeln, sondern auch positive Eigendoppelbrechung, wie sie bei manchen anderen Proteinfasern, z. B. den Myofibrillen, im einzelnen nachgewiesen ist.

Nun weiß man heute, daß auf Grund der freien Drehbarkeit der Valenzbindung der Streckungsgrad von Proteinmolekeln wechseln kann und daß *bei einer gewissen Streckung Verkürzungsvermögen besteht*, das *thermisch* oder *chemisch* ausgelöst werden kann. Seitdem der fibrilläre Feinbau des Spindelapparates durch die Doppelbrechung nachgewiesen ist, erhält die *Zugfasertheorie der Chromosomenbewegung*, wie ich an den genannten Stellen mehrfach hervorgehoben habe, eine neue Stütze. Zwar hat FREY-WYSSLING in seinem ausgezeichneten Buche „Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate“<sup>2</sup> geäußert (S. 180), daß ein solcher Mechanismus gegenüber der Auffassung, die *Chromosomen regulierten ihre Wanderung von sich aus, kaum einen*

<sup>1</sup> Die einschlägigen Angaben finden sich in meinem Buch „Die Doppelbrechung von Karyoplasma, Zytoplasma und Metaplasma“, Protoplasmanomographien (Berl.) 11 (1937) auf S. 121–124 zusammengestellt.

<sup>2</sup> FREY-WYSSLING: Protoplasmanomogr. 15 (1938).

Vorzug bedeute; denn man müsse jetzt annehmen, daß nur die mit den Chromosomen verbundenen Fasern sich verkürzten, die von Pol zu Pol sich spannenden dagegen nicht.

Dieser Einwand scheint mir keine entscheidende Bedeutung gegen die Zugfasertheorie zu haben. Zunächst liegen im Schrifttum Angaben vor<sup>1</sup>, daß Chromosomen, die ihren *Spindelfaseransatz verloren* haben, nicht in den Gang der Mitose eingeordnet werden können. Diese Umstände sprechen sehr nachdrücklich *gegen* die Fähigkeit der Chromosomen, sich aus eigener Kraft zu den Polen zu bewegen. Weiter betont L. GEITLER<sup>2</sup>, daß bei der Endomitose Spindelbildung *fehlt* und *daher* keine gerichteten Bewegungen der Chromosomenpaare eintreten: es fehlt die Einordnung der Chromosomen in die Äquatorialplatte, es fehlt das Auseinanderweichen der Chromosomen. So bezeichnet GEITLER die *Spindel* als ein *Mittel der geregelten Aufteilung der Chromatiden*.

Aber vor allem ist in neuerer Zeit sehr bezweifelt worden, ob überhaupt zur Zeit des Auseinanderweichens der Tochterchromosomen noch *faserige Verbindungen zwischen den Polen* bestehen. BERNHARD SCHNEIDER<sup>3</sup> hat sich jüngst eingehend mit dieser Frage beschäftigt, und er sagt (zum Teil gestützt auf WASSERMANN), bei der Teilung der tierischen Zelle würde in der Regel der Teilungsraum *unmittelbar* nach der Trennung der Tochtersterne durchgeteilt, ja, wenn hier mehr oder minder große Reste des Teilungsapparates länger erhalten blieben, dann stellten sie für die Trennung der beiden Tochterzellen ein *Hindernis* dar (a. a. O. S. 841).

Bekanntlich<sup>4</sup> sieht man aber bei vielen tierischen und besonders pflanzlichen Zellen zwischen den auseinanderweichenden Tochterplatten eine *faserige Struktur* auftreten, die sich „in demselben Tempo und Ausmaß, wie die Chromosomen sich voneinander entfernen“ (WASSERMANN), entwickelt, den sogenannten *Zwischenkörper*. WASSERMANN (a. a. O. S. 403) betont, daß er von *anderer Beschaffenheit* ist als die Spindel. Ich möchte seine *Entstehung* so deuten, daß durch das Auseinanderweichen der Gruppen der Tochterchromosomen ein *Zug auf das zwischen ihnen befindliche* und von den Seiten her einströmende *Plasma ausgeübt* wird, welches *dadurch fibrilläre Struktur annimmt*. Der Zwischenkörper zeigt schon im Leben eine *auffallend grobfaserige Beschaffenheit*, was man z. B. aus den bekannten Bildern von BÉLÁR (Reifeteilung aus dem Hoden von *Stenobothrus lineatus*, s. bei WASSERMANN, Fig. 173—179,

<sup>1</sup> Vgl. bei L. GEITLER: Chromosomenbau. Protoplasmamonogr. 14 (1938) (s. S. 46; BELLING, NAWASCHIN, MATHER & STONE, RILEY).

<sup>2</sup> GEITLER, L.: Die Entstehung der polyploiden Somakerne der Heteropteren durch Chromosomenteilung ohne Kernteilung. Chromosoma 1, 1—22 (1938).

<sup>3</sup> SCHNEIDER, B.: Die Zellteilung der Pflanzenzelle im Reihenbild (Beobachtungen an *Tradescantia virginica*). Z. Zellforsch. 28, 829—860 (1938).

<sup>4</sup> Vgl. bei F. WASSERMANN: Wachstum und Vermehrung der lebendigen Masse. Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, herausgeg. von W. v. MOELLENDORFF, Bd. 1, Teil 2. Berlin 1929.

S. 160) entnehmen kann, in auffallendem Gegensatz zu der glatten Beschaffenheit von Pol-, Zentralspindel- und Halbspindelfasern.

Solcher Unterschied dürfte mit der verschiedenen *Entstehung* der beiderlei Fasern zusammenhängen, indem bei der Kernspindelbildung die Fibrillen im Plasma neu gebildet werden, bei dem Auftreten des Zwischenkörpers aber das *Plasmagel*, das man sich mit FREY-WYSSLING (a. a. O.) als ein Molekulargerüst aus Proteinmolekeln vorzustellen hat, *nur in bestimmter Richtung gezerrt* und dadurch faserig wird, ähnlich wie ein Wattebäuschchen, dessen Baumwollfasern man durch Ziehen parallelisieren kann.

Auch das Vorkommen von Spindeln, bei denen weder im frischen Präparat noch im fixierten fibrilläre Differenzierung zu beobachten ist, wird man nicht gegen die Zugfasertheorie verwerten können. Denn für die Chromosomenbewegung in ihrem Sinne würde die Anwesenheit parallelisierter Proteinmolekeln genügen, ohne daß in jedem Falle diese durch Zusammenfassung zu Bündeln genügender Dicke als mikroskopisch sichtbare Fibrillen in die Erscheinung treten müßten.

#### I. Die Doppelbrechung der Kernspindel im Ei von *Cerebratulus lacteus*.

Zunächst sei die Doppelbrechung des Spindelapparates an einem neuen Objekt geschildert, nämlich dem sich *furchenden Ei* von *Cerebratulus lacteus* HUBE. Davon standen mir sowohl mit Eisenhämatoxylin gefärbte Schnitte als auch mit Boraxkarmin schwach tingierte Total-

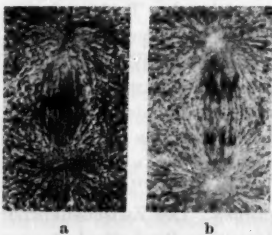


Abb. 1a und b. *Cerebratulus lacteus*, Ei: a Metaphase, b Anaphase der I. Furchungsspindel nach Schnitten durch das Ei, die mit Eisenhämatoxylin gefärbt wurden. 650 : 1.

präparate zur Verfügung, die ich bereits vor Jahren aus gekauftem Material angefertigt hatte. Daß bei solchen Eiern die positive Doppelbrechung der Fasern der winzigen ersten Richtungsspindel an Schnittpräparaten sich beobachten läßt, hatte ich bereits früher kurz mitgeteilt<sup>1</sup>.

Unterrichten wir uns vorweg über die *morphologischen Verhältnisse* an Hand gefärbter Schnitte. Abb. I erläutert Metaphase und Anaphase der ersten Furchungsspindel mit ihrer näheren Umgebung an Photogrammen. Bei der Metaphase (Abb. 1a) erscheint die Äquatorialplatte in Kantenansicht strichartig, mit kleinen dichtgedrängten Chromosomen. Die Kernspindel hat elliptischen Umriß, ist deutlich gefasert, und zwar so, daß die mittleren Fasern geradlinig verlaufen, die äußeren aber mehr und mehr die dem Umriß entsprechende Durchbiegung annehmen. Die Enden der Spindel reichen nicht ganz bis in

<sup>1</sup> SCHMIDT, W. J.: S. hier Anm. I, S. 254.



das Zentrum der schwächer hervortretenden Polstrahlungen, was wohl mit kleiner Abweichung der Spindelachse von der Schnittebene zusammenhängt; jedoch ist im unteren Pol das Centriol zu sehen. In der Anaphase (Abb. 1b) bieten sich die Spindelpole gleich zwei hellen Flecken dar, jeder umgeben von der Polstrahlung. Die Chromosomen, deren geringe Größe jetzt klar hervortritt, bilden bereits weit auseinandergelegene Tochterplatten und zeigen Beziehungen zu Zugfasern. Den von den Tochterplatten begrenzten mittleren Raum erfüllt der Zwischenkörper als eine undeutliche grobe Faserung, die parallel der Spindelachse verläuft und deren Breite den Tochterplatten entspricht.

Man kann die *Doppelbrechung* des Spindelapparates an *Schnitten* feststellen, freilich am besten nicht einfach zwischen gekreuzten Nikols,

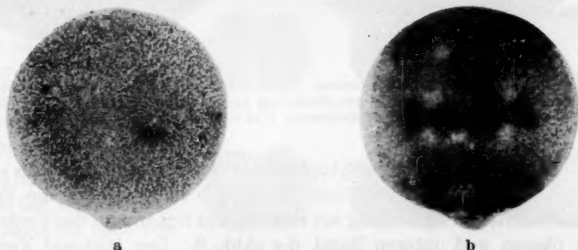


Abb. 2a und b. *Cerebratulus lacteus*, Ei, Totalpräparat mit I. Furchungsspindel:  
a in gewöhnlichem Licht, b zwischen gekreuzten Nikols unter Wirkung  
einer drehbaren  $1/16 \lambda$ -Glimmerplatte. 370:1.

sondern unter Wirkung einer drehbaren  $1/16 \lambda$ -Glimmerplatte, die je nach dem Drehungssinn die anisotropen Anteile des Objektes heller (Additionslage) oder dunkler (Subtraktionslage) als das Sehfeld werden läßt. Mit dieser äußerst empfindlichen Einrichtung erkennt man auch an Schnittpräparaten einwandfrei das positive Vorzeichen der Spindelfasern, während an den (allerdings ziemlich kräftig gefärbten) Chromosomen niemals Doppelbrechung nachweisbar war. Die polarisationsoptischen Erscheinungen sind aber so zart, daß sie sich photographisch schwer erfassen lassen, und daher behandle ich im folgenden die Verhältnisse an Hand von *Totalpräparaten*, bei denen das faserige Material in voller Schichtdicke optisch zur Wirkung kommt.

Abb. 2 stellt ein *Cerebratulus*-Ei mit erster Furchungsspindel in der *Pro-* bis *Metaphase* dar. Im gewöhnlichen Licht (a) gewahrt man zart angedeutet die beiden Polstrahlungen. Zwischen gekreuzten Nikols (b) zeigt sich unter Wirkung der Glimmerplatte am Ort jeder Polstrahlung eine *sphäritenkreuzartige Erscheinung* aus einem (vertikalen) hellen und einem (horizontalen) dunklen Balken. Aus dem Drehungssinn der Glimmerplatte ergibt sich positives Vorzeichen der Doppelbrechung in bezug

auf die Länge der Polstrahlen. Demnach sind die (positiv wirkenden) Proteinmolekeln in den Strahlen längs geordnet, wie das bei Faserstruktur zu erwarten ist. Beim Drehen des Objektisches bleibt das geschilderte Verhalten im wesentlichen unverändert, indem die hellen und dunklen Büschel in immer neue Anteile der Astrosphäre sich verlagern. Beiläufig

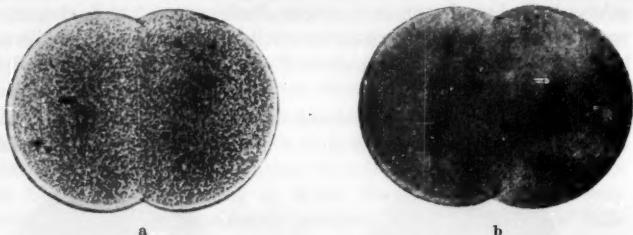


Abb. 3 a und b. *Cerebratulus lacteus*, Ei, Totalpräparat eines Zweizellenstadiums, jede Blastomere in Anaphase: a in gewöhnlichem Licht, b zwischen gekreuzten Nikols unter Wirkung einer drehbaren  $1/16 \lambda$ -Glimmerplatte. 370 : 1.

bemerkt, verrät auch das Cytoplasma in der Peripherie des Eies schwache Doppelbrechung von positivem Vorzeichen in bezug auf die Tangente: man beachte die Aufhellung am rechten und linken und die Verdunkelung am oberen und unteren Rand der Abb. 2. Das läßt auf Verlauf der Proteinmolekeln parallel der Eioberfläche schließen.

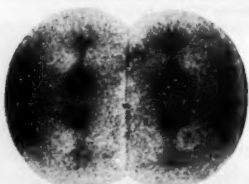


Abb. 4. *Cerebratulus lacteus*, Ei, Totalpräparat eines Zweizellenstadiums in Anaphase zwischen gekreuzten Nikols unter Wirkung einer drehbaren  $1/16 \lambda$ -Glimmerplatte. 370 : 1.

Betrachten wir nun den weiteren Fortgang der Teilung. Abb. 3 zeigt die beiden Blastomeren eines Zweizellenstadiums in der Anaphase. Im gewöhnlichen Licht (a) sind die Polstrahlungen nur schwach kenntlich, deutlicher die Spindelfasern und (vor allem in der linken Blastomere) auch Andeutungen der Gruppen der Tochterchromosomen. Polarisationsoptisch geprüft (Abb. 3 b) bietet sich zunächst um jeden Pol (vor allem in der linken Zelle) das uns schon bekannte positive

Kreuz dar (hier mit dem hellen Balken horizontal infolge gegensätzlichen Drehungssinnes der Glimmerplatte im Vergleich zu Abb. 2 b). Weiter aber spannt sich eine schlanke spindelförmige Verbindung zwischen den beiden Polen aus, die in die vertikalen dunklen Büschel der Polstrahlung übergeht, offenbar die Spindelfasern, die also ebenfalls positives Vorzeichen besitzen. Im Äquator der Spindel zeigt sich eben angedeutet eine leichte Unterbrechung. Ob die Chromosomen Doppelbrechung besitzen, läßt sich nicht sicher unterscheiden. Sehr auffällig tritt die *Halbierung* der

*Spindel* in der weiter fortgeschrittenen Anaphase (Abb. 4) hervor: sie erscheint unter der Wirkung der Glimmerplatte in zwei stumpfe Kegel mit abgerundeter Spitze und von undeutlich faseriger Beschaffenheit zerlegt, die durch einen helleren, ziemlich breiten Raum getrennt sind, in den einzelnen Fasern eben noch wahrnehmbar hineinragen. Die Breite der Spindelhälften in der Äquatorgegend ist jetzt größer als bei der ungeteilten Spindel.

Daß die beschriebenen positiv doppelbrechenden stumpfkegeligen Gebilde in Abb. 4, die ihre verjüngten Enden den Polen zukehren, tatsächlich die Spindelhälften sind, lehrt wohl überzeugend ein Vergleich mit Abb. 1b, die einen entsprechenden Teilungszustand in gewöhnlichem Licht wiedergibt; die Chromosomen verhalten sich nach Lage, Form und Ausdehnung der Tochterplatten so ganz anders, daß ihre wesentliche Beteiligung an dem geschilderten Bilde in polarisiertem Licht ausgeschlossen erscheint.

In Abb. 5 schließlich habe ich die entsprechenden Verhältnisse noch von zwei anderen Zweizellenstadien bei schwächerer Vergrößerung wiedergegeben, in gewöhnlichem Licht (a und d) und in polarisiertem, und zwar

einerseits unter subtraktiver Wirkung der Glimmerplatte (b und e: Spindel dunkel), andererseits unter additiver (c und f: Spindel hell). Das obere Zweizellenstadium stellt einen etwas früheren Teilungszustand dar als das untere, wie aus der schlankeren Beschaffenheit der Spindel am ersten zu entnehmen ist. Diese Bilder sollen bezeugen, daß die oben geschilderten Doppelbrechungserscheinungen immer in der gleichen gesetzmäßigen Weise wiederkehren.

Die Untersuchung des *Cerebratulus*-Eies hat also ergeben, daß Polstrahlen und Spindel aus positiv doppelbrechenden Fasern bestehen, und daß schon in der Anaphase die Spindel von einem äquatorialen, vom Zwischenkörper erfüllten Raum in zwei Hälften geschieden wird, in dem keine Doppelbrechung wahrnehmbar ist. Der Zwischenkörper unterscheidet sich also auch in seinem polarisationsoptischen Verhalten deutlich von den Spindelfasern, was mit seiner anderen Art der Entstehung zusammenhängen dürfte (vgl. S. 255—256).

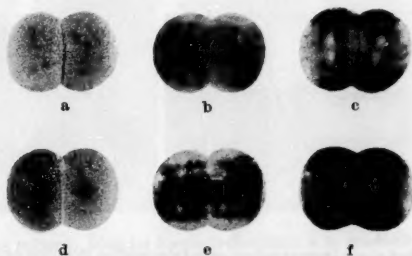


Abb. 5 a—f. *Cerebratulus lacteus*, Ei Totalpräparate zweier Zweizellenstadien: a, b, c und d, e, f: a und d in gewöhnlichem Licht, die übrigen Teilfiguren zwischen gekreuzten Nikols und unter Wirkung einer drehbaren  $1/16\lambda$ -Glimmerplatte, und zwar b und e in subtraktivem, c und f in additivem Sinne. 165:1.

## II. Die Doppelbrechung der Kernspindel im Ei von *Psammechinus miliaris*.

Die geschilderten Verhältnisse bei *Cerebratulus* gaben mir Veranlassung, meine Befunde am lebenden Ei von *Psammechinus miliaris* nochmals zu überprüfen. Hatte ich doch damals die Ansicht vertreten, daß das zwischen den Polen der Kernspindel befindliche positiv doppelbrechende „Ellipsoid“, das sich im Laufe der Teilung in der Mitte quer durchtrennt, wesentlich durch die *Chromosomen* verursacht werde (Literatur s. bei Anm. 1, S. 253). Nachdem nun für die äußerst ähnlichen Bilder in polarisiertem Licht bei *Cerebratulus* durch Vergleich mit gefärbten Präparaten das Ellipsoid als Anteil der *Spindel* sich erwiesen hatte, wurde es

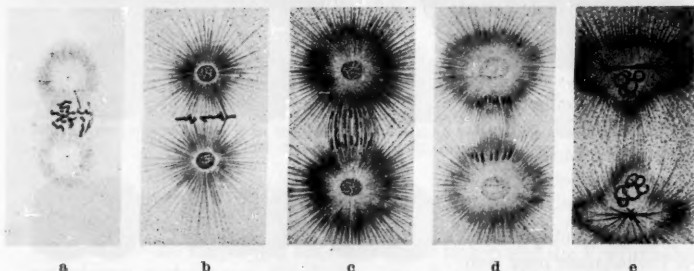


Abb. 6 a-e. *Psammechinus microtuberculatus*, Schnitte durch Eizellen; verkleinerte Wiedergabe von Teilen der Abb. 70, 27, 28, 29, 32 von TH. BOVERI, Z. Naturwiss. 35 (1901).

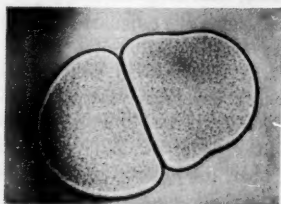
notwendig, auch bei *Psammechinus* gefärbte Präparate zum Vergleich heranzuziehen.

Ich habe im Juli 1938 die Beobachtungen im polarisierten Licht am sich furchenden Seeigeli wiederholt und die früher mitgeteilten Tatsachen vollkommen bestätigen können; ihre *Deutung* aber muß ich zum Teil berichtigen. Leider starb das Material, von dem ich diesmal mit einem stärkeren Objektiv (5 von Leitz) und schwächeren Okular die hier veröffentlichten Photogramme bei etwas höherer Vergrößerung und besserer Auflösung als früher gewann, bald ab, wie ja die Aufzucht im Binnenlande immer mit gewissen Schwierigkeiten verknüpft ist. Dadurch wurde meine Absicht, auch Eier zur Herstellung gefärbter Präparate zu fixieren, vereitelt. Daher ziehe ich zur Erörterung der Verhältnisse des fixierten Objektes Abbildungen aus der Literatur heran. Solche von *Psammechinus miliaris* freilich konnte ich nicht ermitteln; infolgedessen wählte ich die vorzüglichen BOVERISCHEN Bilder<sup>1</sup> betreffend *Echinus microtuberculatus*. Dieses Verfahren dürfte unbedenklich sein: die beiden Formen sind sehr ähnlich, ja wurden öfters miteinander ver-

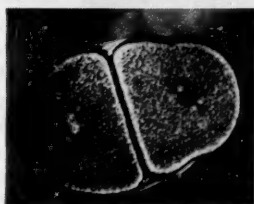
<sup>1</sup> BOVERI, TH.: Zellenstudien IV. Über die Natur der Centrosomen. Z. Naturwiss. 35, 1-220 (1901).

wechselt; beide Arten, ehemals der Gattung *Echinus* eingeordnet, werden jetzt zu *Psammechinus* gestellt als *Psammechinus microtuberculatus* BLAINVILLE bzw. *Psammechinus miliaris* MÜLLER.

Ich schildere also zunächst die Verhältnisse der Furchungsmitose von *Psammechinus microtuberculatus* an Hand der Abb. 6, etwas verkleinerter Ausschnitte BOVERIScher Figuren: a zeigt die beiden Polstrahlungen, in deren Mitte die Centriolen und dazwischen den prophasischen Knäuel; in b, der Metaphase, sind die Polstrahlungen vergrößert, sie umschließen die kugeligen Centrosomen; die Chromosomen sind in die Äquatorialplatte eingeordnet, die in Kantenansicht als Ganzes strichartig erscheint; Zugfasern setzen an die Chromosomen an; c, eine beginnende Anaphase, läßt die auseinanderweichenden Gruppen



a



b

Abb. 7 a und b. *Psammechinus miliaris*, lebendes Zweizellenstadium: a in gewöhnlichem Licht, b zwischen gekreuzten Nikols unter Wirkung einer drehbaren  $1/16 \lambda$ -Glimmerplatte. 185: 1.

der Tochterchromosomen erkennen, die polwärts in horizontaler gerader Linie abschließen; die Kernspindel zwischen den Polen zeigt als Ganzes elliptischen Umriß; in d, einem Endstadium der Anaphase, sind die Gruppen der Tochterplatten weit auseinandergerückt, wobei die Chromosomen in je einer Querreihe geordnet erscheinen; e endlich, eine Telophase, zeigt den Beginn der Rekonstruktion der Tochterkerne; zwischen den beiden schon stark veränderten Polstrahlungen spannt sich ein Bündel von Fasern, wahrscheinlich der Zwischenkörper.

Ein Vergleich dieser Verhältnisse mit dem, was die lebenden Eier von *Psammechinus miliaris* darbieten, ergibt folgendes: Die Strahlungen, die auf den Bildern BOVERIS so schön zutage treten, sind im *gewöhnlichen Licht* am lebenden Objekt stets sehr undeutlich; bei der Vergrößerung, wie ich sie (mit Rücksicht auf die nötige Helligkeit im Polarisationsmikroskop) wählen mußte, sieht man am Ort des Spindelapparates nur eine Aufhellung im Plasma, die durch das Zurücktreten der feinen Körnelung bedingt ist, wie das Abb. 7a erkennen läßt. In *polarisiertem Licht* dagegen zeigt sich der Spindelapparat mit überraschender Deutlichkeit, wie insbesondere die rechte Blastomere lehrt (Abb. 7b): Unter Wirkung der Glimmerplatte erscheinen die beiden

kleinen Polstrahlungen mit hellen und dunklen Anteilen (positives Kreuz) und dazwischen tief dunkel das „Ellipsoid“.

Zieht man nun die BOVERISCHEN Figuren heran, so wird klar, daß das Ellipsoid als Ganzes nicht den Chromosomen entsprechen kann; die Äquatorialplatte (Abb. 6b) kommt gewiß nicht in Frage, aber auch die Chromosomen der Anaphase (c, d) sind auszuschließen, weil die Tochterplatten gegen die Pole hin *geradlinig* abschließen; die kennzeichnende Gestalt des Ellipsoides aber beruht darauf, daß es polwärts einen *gerundeten* Kontur besitzt, so, wie es die *Spindel* (vgl. Abb. 6c) darbietet, die auch im Umfang dem Ellipsoid entspricht.

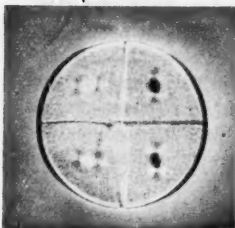
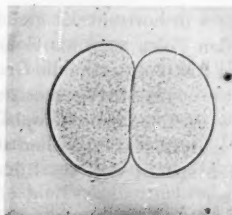


Abb. 8. *Psammechinus miliaris*, lebendes Vierzellenstadium zwischen gekreuzten Nikols unter Wirkung einer drehbaren  $1/16\lambda$ -Glimmerplatte. 185:1.

Abb. 8 betrifft ein Vierzellenstadium, in dem die Mitose nur wenig weiter fortgeschritten ist als in Abb. 7. In den beiden linken Blastomeren erscheint das Ellipsoid in Additionslage, hell, in den beiden rechten aber in Subtraktionslage, dunkel. An dem unteren Ellipsoid der rechten Seite setzt eben die Querteilung ein als ganz geringe Unterbrechung in der Äquatorialgegend. Noch ausgesprochenener ist das in Abb. 9 einem Zweizellenstadium; in gewöhnlichem Licht (a) ist auch hier der Spindelapparat nur schwach kenntlich, in



a



b

Abb. 9a und b. *Psammechinus miliaris*, lebendes Zweizellenstadium: a in gewöhnlichem Licht, b zwischen gekreuzten Nikols unter Wirkung einer drehbaren  $1/16\lambda$ -Glimmerplatte. 185:1.

polarisiertem aber macht sich das Ellipsoid mit mittlerem Querspalt in beiden Blastomeren auffallend bemerkbar. Die Polstrahlungen dagegen zeigen nur geringe optische Wirkung.

Abb. 10 schließlich betrifft ein Zweizellenstadium mit einem noch späteren Zustande der Mitose. In der linken Blastomere sind die beiden Ellipsoidhälften bereits durch einen weiten Raum getrennt; zugleich



ist jede Spindelhälfte rundlicher und kleiner geworden. Bald nachdem dieser Zustand erreicht ist, erlöschen die Doppelbrechungserscheinungen.

Bemerkenswerterweise ist die Stärke der Doppelbrechung der Spindel am lebenden *Psammechinus*-Ei wesentlich höher als die am fixierten *Cerebratulus*-Ei. Es dürfte sich hier wohl nicht nur um spezifische Unterschiede der beiden Formen handeln, sondern im lebenden Zustande hat man neben der Eigendoppelbrechung auch mit positiver Formdoppelbrechung zu rechnen, gemäß dem größeren Unterschied der Brechzahl von Protein und durchtränkendem wässrigem Medium gegenüber dem Balsampräparat.

Nach diesen Befunden muß ich also meine frühere Darstellung betreffend die Doppelbrechungserscheinungen am lebenden, sich furchenden Seeigellei dahin berichtigen, daß das in polarisiertem Licht zwischen den Polen wahrnehmbare *Ellipsoid in der Hauptsache durch die Spindelfasern* verursacht wird; ob die Chromosomen daran beteiligt sind, muß einstweilen dahingestellt bleiben und wird sich erst durch weitere Untersuchungen klären lassen. Der regelmäßige Wechsel im Auftreten und Verschwinden der im polarisierten Licht wahrnehmbaren Strukturen, der mit den Teilungen Hand in Hand geht, ist also — jedenfalls im wesentlichen — auf die *Ausbildung und Rückbildung des Spindelapparates* zu beziehen. Damit scheidet das Seeigellei mindestens einstweilen aus der Reihe der Objekte aus, an denen das optische Verhalten der *Chromosomen* erörtert werden kann.

Sehr bemerkenswert ist die Deutlichkeit, mit der am lebenden Seeigellei in polarisiertem Licht ebenso wie bei den fixierten Präparaten von *Cerebratulus* die *Durchteilung der Spindel* in der Metaphase hervortritt: auch bei *Psammechinus* gibt es, von diesem Stadium an, keine doppelbrechenden Fasern mehr, welche die Pole verbinden, und damit ist ein Argument gegen die Zugfasertheorie (s. S. 255) beseitigt. Weiter verdient Hervorhebung, daß die Polstrahlungen merklich schwächere Doppelbrechung darbieten als die Spindelfasern, obwohl die ersten im Dauerpräparat (gemäß BOVERI's Abbildungen) viel deutlicher hervortreten als jene. Vielleicht spricht sich darin der höhere Streckungsgrad der Proteinmolekeln der Spindelfasern aus, der sie zu ausgiebiger Verkürzung befähigt als die Polstrahlung. Kontraktion von Proteinfasern wird allgemein von *Senkung* der Doppelbrechung begleitet, und wenn also die Spindelfasern nach der Durchteilung der Spindel mit fortschreitender Verkürzung zunehmend schwächer doppelbrechend werden, so steht diese Feststellung mit ihrer Deutung als kontraktionsfähiger Elemente in Einklang.



Abb. 10. *Psammechinus miliaris*, lebendes Zweizellenstadium zwischen gekreuzten Nikols unter Wirkung einer drehbaren 1/16 λ-Glimmerplatte. 185 : 1.

### Zusammenfassung.

Im fixierten sich furchenden Ei von *Cerebratulus lacteus* wirken Polstrahlen und Spindelfasern positiv doppelbrechend in bezug auf ihre Länge. Mit dem Einsetzen der Anaphase tritt völlige Unterbrechung der Spindelfasern im Äquator ein, die sich als Auftreten eines isotropen Spaltraumes in polarisiertem Licht kenntlich macht. Von diesem Stadium ab besteht also keine Verbindung mehr zwischen den Polen durch doppelbrechende Fasern; der mit dem Auseinanderweichen der Gruppen der Tochterchromosomen sich entwickelnde Zwischenkörper verrät keine Doppelbrechung, was wohl als Hinweis auf seine gegenüber den Pol- und Spindelfasern andersartige Entstehung und Beschaffenheit gelten kann.

Ein Vergleich der an gefärbten Präparaten ermittelten Verhältnisse beim Seeigeli (Abbildungen BOVERI von *Psammechinus microtuberculatus*) mit dem, was das lebende sich furchende Ei von *Psammechinus miliaris* in polarisiertem Licht darbietet, nötigt, das zwischen den Polen erscheinende doppelbrechende „Ellipsoid“, das ich früher mit den Chromosomen in Zusammenhang gebracht hatte, im wesentlichen auf die Spindelfasern zwischen den Polen zu beziehen. Demnach ist auch die Halbierung des Ellipsoids als Durchteilung der Spindelfasern unter Auftreten eines isotropen Zwischenraumes zu betrachten.

Die Tatsache, daß von der Anaphase ab zwischen den Polen der Kernspindel keine doppelbrechende Verbindung mehr nachweisbar ist, beseitigt den gegen die Zugfasertheorie der Chromosomenbewegung möglichen Einwand, daß bei Kontraktion der faserigen Spindelanteile zwar die Zugfasern die Chromosomen gegen die Pole bewegen, aber die Zentralspindelfasern die Pole einander nähern würden. Der Umstand aber, daß das faserige Material zwischen den Polen vor der Durchteilung der Spindel auffallende Doppelbrechung besitzt, die mit dem Verkürzen der Spindelhälften allmählich erlischt, entspricht durchaus dem Verhalten, daß bei Proteinfasern mit der eintretenden Kontraktion zu erwarten ist.

# KERNWACHSTUM DURCH CHROMOSOMENVERMEHRUNG ALS REGELMÄSSIGER VORGANG BEI DER PFLANZLICHEN GEWEBEDIFFERENZIERUNG.

Von

INA GRAFL.

Mit 4 Textabbildungen (17 Einzelbildern).

(Eingegangen am 7. Juli 1939.)

## Einleitung.

An Pflanzen wurde echtes Kernwachstum, d. h. Vermehrung von Chromatin, schon gelegentlich festgestellt (Zusammenfassung bei GEITLER 1938), eine eingehendere Untersuchung darüber liegt aber bisher nur in der Arbeit von GEITLER über *Sauromatum guttatum* vor. Diese Pflanze ist insofern günstig, als sie erstens sehr verschiedene Kerngrößen besitzt und zweitens die Struktur ihrer Kerne — es sind Chromocentrenkerne — leicht analysierbar und mit dem Chromosomensatz in Verbindung zu bringen ist. Das Ergebnis der Untersuchung GEITLERs ist kurz folgendes: Die Ruhekerne bestehen aus entspiralisierten Chromosomen in pachynematischer Ausbildung. Sie liegen einzeln oder in Gruppen, wobei ihre heterochromatischen Mittelstücke die Chromocentren bilden. Das Wachstum des Kernes erfolgt unter vollständiger Aufrollung des Chromonemas durch Wachstum der Chromomeren und der Verbindungsfäden, wodurch auch die Gliederung in Eu- und Heterochromatin deutlich wird. Eine Vermehrung der Chromosomen, jedenfalls eine beträchtliche, ließ sich nicht wahrscheinlich machen.

Es wäre somit hier eine dritte Art des Kernwachstums festgestellt, anders als es bei den Schleifenkernen der Dipterenlarven erfolgt und anders als es bei den Riesenkernen der Wanzen geschieht. In den letzten beiden Fällen wird das Wachstum hauptsächlich durch eine „innere Teilung“ erreicht, wenn diese auch infolge der unterschiedlichen Chromosomenausbildung bei Wanzen und Dipteren ein verschiedenes Aussehen hat; der gesamte Ablauf der Endomitose läßt sich nur an Wanzen verfolgen (GEITLER 1939).

Nun gehört aber zu den Untersuchungen GEITLERs, wie der Verfasser selbst sagt, als Ergänzung die Beobachtung der Meiose, um pachynematische Chromosomen wirklich zu sehen, und außerdem auch der direkte Beweis durch die Teilung solcher herangewachsener Kerne. Dann müßte sich ihr Bau eindeutig klären lassen.

Es ist inzwischen gelungen, diese Beobachtungen zu machen.

## Material und Methode.

Die Meiose von *Sauromatum guttatum* wurde in den Antheren verfolgt, die Teilung der großen somatischen Kerne in den äußeren Zellschichten

der oberen Hälfte der Knolle. Letztere erfolgt erstens bei Beginn des Wurzelwachstums: das vor der Wurzelspitze liegende, ausdifferenzierte Gewebe teilt sich dann wieder und wächst eine Zeitlang mit, so daß eine Wurzeltasche entsteht; zweitens gelingt es, Teilungen hervorzurufen, indem man die Hüllblätter zur Zeit des Laubblattwachstums an ihrer Basis abreißt. Wir haben in diesem Fall also ein schönes Beispiel vor uns für die teilungsanregende Wirkung eines Wundreizes. Auch wenn man Knollen quer durchschneidet und mit Gewebebrei bedeckt, treten Teilungen auf, wie überhaupt an allen verletzten Stellen der oberen Knollenhälfte. Doch tritt die Wirkung an den Blattbasen schneller ein, vielleicht, weil diese Stellen zur Wundkorkbildung präformiert sind, da die Hüllblätter vor der Laubblattentfaltung zugrunde gehen.

An günstigen Stellen kann man deutlich erkennen, daß der Teilungsimpuls von der Wundfläche ausgeht. Die dem Wundrand näher liegenden Kerne sind nämlich den entfernter liegenden Kernen immer um einige Phasen in der Mitose voraus. Ist z. B. der eine Kern in später Prophase, so befindet sich der andere in Ruhe; einer Anaphase im ersten entspricht ein Zerstäubungsstadium im zweiten Kern, einer Telophase im ersten Kern eine Prophase im zweiten. Die Wandbildung erfolgt immer parallel zum Wundrand, die Spindel steht also senkrecht auf ihm.

Die Kerne dieser äußeren Zellschichten der Knolle erreichen annähernd die gleiche Größe wie die Kerne der ausgewachsenen Spatha und des Appendix (vgl. GEITLER 1938) und sind mit diesen auch ihrer Struktur nach durchaus zu vergleichen. Sie sind in der Nähe der untersten Hüllblätter am größten. Gegen das Innere der Knolle nehmen sie an Größe ab und werden schließlich in der Mitte auffallend klein, sie werden aber auch gegen die oberen Hüllblätter zu kleiner.

Das sporogene Gewebe wurde in 1 Teil Essigkarmin und 1 Teil Alkohol-Eisessig (3:1) fixiert und nach einigen Tagen in heißem Essigkarmin untersucht (vgl. H. ERNST 1938). Die Erfolge damit waren sehr gut; besonders für die Untersuchung der Leptotän- und frühen Pachytänstadien scheint dieses Verfahren empfehlenswert.

Die übrigen Untersuchungen fanden meist an Material statt, das unmittelbar oder nach vorheriger Fixierung in Alkohol-Eisessig in heiße Karmin-Essigsäure gelangte. Zum Vergleich wurden Mikrotomschnitte herangezogen von Gewebe, das mit dem Gemisch nach FLEMMING-BENDA fixiert und mit Safranin-Lichtgrün gefärbt worden war.

### Untersuchungen.

Die Mitosen der herangewachsenen Kerne brachten als unerwartetes Ergebnis die Feststellung, daß *diese Kerne polyploid sind*. Es konnten je nach Kerngröße diploide, tetraploide und octoploide Metaphaseplatten ausgezählt, d. h. 26, 52 und 104 Chromosomen beobachtet werden. Einige Kerne des Gewebes lassen auf eine noch höhere Stufe der Polyploidie schließen, in Teilung wurden sie jedoch nicht gesehen.

Besonders interessant und für das Verständnis der großen Kerne wesentlich ist es nun, den Ablauf der polyploiden Teilungen von Beginn an zu verfolgen.

Die erste Teilung nach der Verwundung zeigt sich damit an, daß die sonst mehr oder weniger deutlich voneinander getrennten Chromocentren ineinander übergehen (die Chromocentren dieser Kerne sind übrigens nie so deutlich getrennt wie z. B. in der Epidermis des Appendix). Die ganze Kernoberfläche ist dann mit Chromomeren (oder optischen Querschnitten durch Chromonemata) besetzt. Obwohl die Körnelung insgesamt bemerkenswert fein wird, bleiben die ursprünglichen Chromocentren als Ansammlungen von heterochromatischen Chromomeren erkennbar (Abb. 1a und 1b). Auch die großen Kerne durchlaufen also eine Art Zerstäubungsstadium, wie es GEITLER schon für die normalen diploiden Mitosen bei *Sauromatum* nachgewiesen hat. Auffallend ist, daß der so klumpige, aus einem anderen Heterochromatin als die proximalen Abschnitte der übrigen Chromosomen bestehende Trabant die Zerstäubung mitmacht. Es bleiben nur die ersten, dem Nucleolus unmittelbar anliegenden Chromomeren als besonders große, heterochromatische

Körper erkennbar. Oft aber ist es überhaupt unmöglich, die Trabantenchromosomen mit Sicherheit aufzufinden.

Weiterhin differenzieren sich deutliche Gruppen von Chromosomen heraus. Die heterochromatischen Mittelstücke liegen beisammen, die euchromatischen Enden strahlen davon aus. An den kleinsten Gruppen octoploider Kerne lassen sich bald je vier gleiche Chromosomen unterscheiden, die größeren Chromocentren werden von verschieden gestalteten Chromosomengruppen gebildet (Abb. 2a). Es sind also nicht einzelne Chromosomen, die sich herausdifferenzieren, sondern die aus einem Chromosom — bzw. in größeren Gruppen die aus mehreren Chromosomen — hervorgegangenen Tochterchromosomen. Daß nur Vierergruppen und keine Achtergruppen in octoploiden Kernen auftreten, liegt daran, daß die homologen Chromosomen der diploiden Ausgangskerne keinerlei nähere Lagebeziehung zueinander haben, wie ohne weiteres an den SAT-Chromosomen ersichtlich ist. Die homologe Gruppe von vier als solche erkennbaren Tochterchromosomen kann auch mit einer anderen Chromosomengruppe in einem größeren Chromocentrum vereinigt sein.

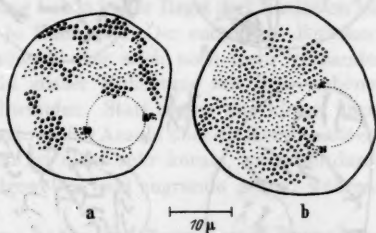


Abb. 1 a und b. Kerne aus den äußeren Zellschichten der oberen Knollenhälfte. a in Ruhe, b im Zerstäubungsstadium. Dargestellt sind Teile der Oberfläche und der Nucleolus; die Trabantengruppen liegen einander gegenüber (in a rechts und links, in b oben und unten). ALK.-Eisessig-Essigkarmin.

Daraus ist es zu erklären, wenn im folgenden nur über Gruppen von vier bzw. im Fall tetraploider Kerne von zwei Chromosomen gesprochen wird.

Es verdient hervorgehoben zu werden, daß die *auseinander entstandenen Chromosomen beieinander liegen*. Dies ist wohl eine Folge ihrer heterochromatischen Beschaffenheit. Während des Übergangs zur Metaphase entfernen sich die Chromosomen voneinander. Dabei gehen die Enden

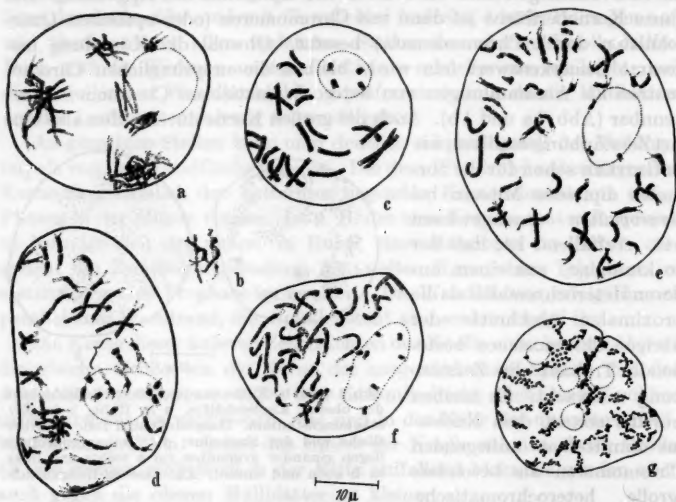


Abb. 2a—g. Mitosen polyploider Kerne. a—e aus einer ersten Teilung nach der Verletzung. a frühe Prophase eines 8 n-Kernes. Die Trabantengruppen (je 4 Chrom.) an gegenüber liegenden Stellen, in der Mitte oben und links am Nucleolus je eine Vierergruppe. b eine Vierergruppe früher als a. c mittlere Prophase eines 4 n-Kernes (Zweiergruppen!). d mittlere Prophase eines 8 n-Kernes. An gegenüberliegenden Seiten des Nucleolus je eine Gruppe von 4 Trabanten (die linke stärker gelockert als die rechte). Oberhalb des Nucleolus, durch die Klammer gekennzeichnet, 4 Tochterchromosomen. e späte Prophase eines 8 n-Kernes. Es sind nicht alle Trabanten gezeichnet. f Prophase aus einer zweiten Teilung (keine Gruppenbildung mehr!). g Ruhekern aus dem Wundkork.

Alk.-Eisessig-Essigkarmin.

voraus, die Spindelansatzstellen haften am längsten aneinander. Wir bekommen so die charakteristischen Kreuz- und Paarbilder, wie sie Abb. 2c veranschaulicht. Verfolgt man die Prophase octoploider Kerne, so zeigt sich weiter die interessante Tatsache, daß die Chromosomen einer Vierergruppe zu je zwei und zwei enger beisammen bleiben (Abb. 2b und d). Die Chromosomen führen also eine Trennungsbewegung aus, die verschieden stark und unabhängig von der Spindel ist. Der Zeitpunkt ihrer Entstehung, die Dauer ihrer Selbständigkeit also, scheint hier deutlich eine Rolle zu spielen. Beim Übergang zur Metaphase geht die



ursprüngliche Anordnung verloren, so daß in Metaphaseplatten überhaupt keine Gruppen von gleichartigen Chromosomen mehr vorhanden sind.

Es erschien nun wünschenswert, auch die weiteren Teilungen bis zur Ausbildung der endgültigen Ruhekerne des Wundkorkes anzusehen.

Die Bilder entsprechen ganz den Erwartungen. In der folgenden Prophase tritt nicht mehr die typische „Paarung“ der Chromosomen auf, sondern diese liegen anscheinend regellos wie in einer gewöhnlichen diploiden Mitose, jedoch in vermehrter Anzahl (Abb. 2f). Während in den ersten Mitosen ein kugeligter Nucleolus vorhanden ist, sind in den zweiten Mitosen zwei Nucleolen oder ein langgestreckter Nucleolus zu sehen. Dieser zeigt meist noch die Spuren seiner Entstehung aus mindestens zwei Nucleolen. Die Trabanten liegen den Nucleolen regellos verteilt an. Die Telophasen der dritten Teilung haben in der Regel drei Nucleolen mit ein, zwei oder drei Trabanten je Nucleolus. Der endgültige Ruhekern hat meist vier Nucleolen; es können aber auch noch mehr vorhanden sein. Das charakteristische Bild großer Ruhekerne mit ihren schönen großen Chromocentren ist verschwunden. Statt dessen sind kleine, unzusammenhängende Chromozentren in großer Anzahl über die Kernoberfläche verteilt (Abb. 2g). Ihre Struktur ist nicht sehr körnig, was wohl daran liegt, daß die Kerne des Wundgewebes bald zugrunde gehen, während die Zellen verkorken.

So ergibt sich also folgendes: haben die Chromosomen einmal den mitotischen Zyklus durchlaufen, d. h. waren sie einmal in metaphasischem Zustand, so sind die Beziehungen zwischen den Tochterchromosomen gelockert. Es scheint, daß zuerst noch eine gewisse Lagebeziehung besteht, die sich jedoch im Laufe mehrerer Mitosen verliert. Es sind dann Gruppen gleichartiger Chromosomen nicht mehr zu sehen, wie ja schon die erhöhte Nucleolenzahl in den späteren Kernen auf eine gleichmäßigere Verteilung der SAT-Chromosomen im Kernraum schließen läßt. Damit soll natürlich nicht gesagt sein, daß die Chromosomen nun willkürlich und dem Zufall überlassen in dem Kern verteilt sind.

Die *Trabanten* verdienen bei dem Teilungsablauf eine gesonderte Beachtung. Die großen Ruhekerne hatten zu der Vermutung Anlaß gegeben, daß die zwei an den Nucleolen sichtbaren, homogen bis körnig erscheinenden Trabanten mit ihren Ausstrahlungen je einem ganzen Chromosom entsprechen. Die Prophase zeigt aber, daß diese Gebilde je eine vollständige Gruppe von Tochter SAT-Chromosomen<sup>1</sup> darstellen. Die einzelnen SAT-Chromosomen lösen sich wie die anderen Chromosomen voneinander, bis man z. B. in octoploiden Kernen deutlich acht Trabanten zählen kann. Sie liegen dann zu je vier auf gegenüberliegenden Seiten, wobei wieder die Verbindung von je zweien enger ist.

<sup>1</sup> Wie die Angaben GETTLERS über den Bau der prophasischen SAT-Chromosomen in gewöhnlichen, diploiden Mitosen zu erklären sind, wird in einer späteren Arbeit erörtert werden.

Während der meiotischen Prophase zeigen die SAT-Chromosomen eindeutig, daß der Nucleolus nicht seiner ganzen Länge nach der sekundären Einschnürung eingeschaltet ist, sondern ihr seitlich anliegt. So günstig aber die Kerne von *Sauromatum* sonst für Untersuchungen sind, die Stadien des Leptotäns und Pachytäns sind infolge ihrer Kleinheit, Empfindlichkeit und Unübersichtlichkeit für exakte Bestimmungen wenig geeignet. Doch kann man erkennen, daß die Berührungsstelle des SAT-Chromosoms mit dem Nucleolus zwischen dem ersten und zweiten besonders stark gefärbten, heterochromatischen Chromomer liegt. Die Spindelansatzstelle liegt zwischen 2. und 3. Chromomer, wie es besonders die Diplotänbilder annehmen lassen. Auf

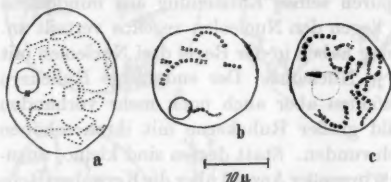


Abb. 3a—c. Kerne der meiotischen Prophase. a Leptotän. Die SAT-Chrom. sind nicht in ihrer gesamten Länge dargestellt, da sie in diesem frühen Zustand im Gewirr der anderen Chromosomen sich nicht verfolgen lassen. b frühes Pachytän. Die beiden ersten Chromomeren des SAT-Chromosoms erscheinen als ein Chromomer, da sie in Deckung liegen. c spätes Pachytän. Fix.-Gemisch nach H. ERNST.

drei weitere heterochromatische Chromomeren folgen nach einem etwas größeren Abstand vier bis fünf euchromatische Chromomeren (Abb. 3b).

Erwähnen möchte ich, daß die großen Kerne des äußeren Knollengewebes oft die Trabantenchromosomen als ausgestreckte Arme zeigen, an denen man die meiotische Struktur fast ablesen

kann, während sie z. B. bei Raphiden-, Spatha- oder Appendixkernen oft mehr oder weniger homogene Körper mit euchromatischen Ausstrahlungen nach allen Richtungen bilden. Ausnahmen kommen jedoch in beiden Fällen vor.

Wenn man die Chromomerengröße der meiotischen Chromosomen mit der Chromomerengröße der ausgewachsenen somatischen Kerne vergleicht, so ergibt sich, daß die Leptonemachromomeren kleiner sind und ihr Abstand voneinander geringer ist, als es in irgendeinem größeren Ruhekern der Fall ist. Mit den Chromomeren des Pachynemas lassen sich jedoch diejenigen mancher somatischen Ruhekern in Beziehung setzen (z. B. der Kerne der Spathaepidermis). Größe und Abstand der einzelnen Chromomeren ist hier ungefähr übereinstimmend. Sonst ist fast immer auch gegenüber dem Pachynema ein deutlicher Unterschied vorhanden, wie es der Vergleich von Abb. 1b und 3b veranschaulicht. Die Chromomeren in Appendixkernen sind aber z. B. noch viel größer. Es dürfte sich hier also um Sammelbildungen handeln oder es liegt wirkliches Wachstum von Chromomer und Fibrille vor, wie es GETTLER annimmt, oder es tritt beides im Verein auf.

Die Zahl der Chromomeren des kleinsten Chromocentrums ermittelte GETTLER mit ungefähr 15 heterochromatischen und ungefähr

15 euchromatischen Chromomeren. Leider konnte während der Meiose das entsprechende Chromosom nicht identifiziert werden. In Analogie zu dem ähnlichen SAT-Chromosom läßt sich aber annehmen, daß es aus etwa 8 Chromomeren aufgebaut ist. Dafür spricht auch, daß in der Diakinese immer ein kleines, dem SAT-Chromosom in Größe und Heterochromatinmenge ähnliches Chromosom zu beobachten ist. Wenn man nun die ausgewachsenen Appendixkerne durch einen einfachen Vergleich der Volumina als octoploid betrachtet, so entspricht den vier Tochterchromosomen, die dieses kleinste Chromocentrum bilden, die beobachtete Zahl von etwa 30 Chromomeren. Deren im Vergleich zum Pachynema gesteigerte Größe ist dann nur durch Wachstum der Chromomeren zu erklären.

Ein Indicium für diese Annahme bietet die Chromosomengröße in octoploiden Mitosen. Die Chromosomen sind größer und vor allem dicker als die Chromosomen in Wurzelspitzen oder anderen normalen diploiden Meristemen, also z. B. auch in einer jungen Tochterknolle. Die Chromosomengröße schwankt in all diesen Geweben überhaupt sehr (Abbildung 4).

Für diese Tatsachen kann man bis jetzt noch keine Erklärung geben, doch legen sie in Verbindung mit den größeren Chromomeren in den herangewachsenen Ruhekernen, wie schon gesagt, die Vermutung nahe, daß neben einer unterschiedlichen Spiralisierung eine Größenzunahme der Grundelemente dafür maßgebend ist. Es ist ausgeschlossen, daß die verschiedene Dicke nur eine Folge ungleicher Behandlung mit Karminessigsäure ist, denn auch Präparate, die mit Flemming-Benda fixiert worden waren, zeigen die gleichen Verhältnisse.

Anschließend an diese Überlegungen wurde versucht, die *Volumina der Kerne zu messen*, um eventuelle Beziehungen zwischen Volumen und Chromosomenzahl zu finden. Die Messungen gestalteten sich in den äußeren Teilen des Grundgewebes der Knolle verhältnismäßig leichter als in anderen Geweben. Die Kerne sind rund bis oval, die größeren abgeflacht. Die Zellen sind meist so angeordnet, daß je zwei Tochterzellen einen engeren Verband bilden, der von einer dickeren Zellwand umgeben ist. Bei Beginn der allgemeinen Teilung nach einer Verletzung ereignet

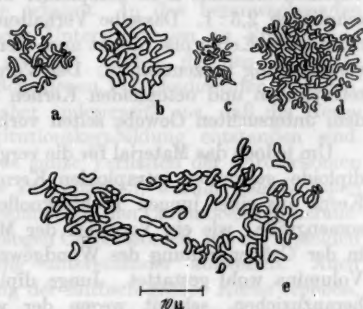


Abb. 4 a-e. Metaphaseplatten: diploide Platten aus der Wurzelspitze (a), aus der jungen Tochterknolle (b), aus der Mitte des wachsenden Appendix (c); d und e octoploide Platten aus dem Wundgewebe (in d sind nicht alle 104 Chromosomen dargestellt, e gezerrt). a, b, c Alk.-Eisessig-Karmin, c, d FLEMING-BENDA.

es sich, wie schon erwähnt, oft, daß der eine Kern eines solchen Zellpaares — nämlich der dem Wundrand näher liegende — sich schon in Teilung befindet, während der andere noch in Ruhe ist. Diese Ruhekerne oder ganz ähnliche aus der nächsten Umgebung wurden nun gemessen. Außerdem wurden auch Prophasen in morphologisch vergleichbarem Zustand den Messungen zugrunde gelegt. Das Ergebnis dieser Messungen ist trotz der ihnen anhaftenden Mängel und großen Schwankungen in der Kerngröße jeder Gruppe eindeutig: *das Volumen von Ruhekernen nimmt um etwas mehr als das Doppelte zu, wenn sich die Chromosomen verdoppeln*. Das Volumenverhältnis z. B. octoploider zu tetraploiden Kernen ist durchschnittlich 2,5 : 1. Dasselbe Verhalten zeigen die Prophasen. Bei Zunahme der Kerngröße nimmt auch der Betrag der prophasischen Kernvergrößerung prozentual zu. Der Vergleich läßt sich gut nur zwischen tetraploiden und octoploiden Kernen ausführen, da diploide Kerne in dem untersuchten Gewebe selten vorkommen.

Um jedoch das Material für die vergleichende Volummessung auch für diploide gegenüber tetraploiden Kernen zu vervollständigen, wurden Kerne aus einer jungen Tochterknolle herangezogen. Da die Chromosomengröße, wie ein Vergleich der Metaphaseplatten zeigt, sich etwa in der Größenordnung des Wundgewebes bewegt, ist ein Vergleich der Volumina wohl gestattet. Junge diploide Kerne aus der Wurzelspitze heranzuziehen, scheint wegen der verschiedenen Chromosomengröße nicht ratsam.

Die Messungen ergaben, daß auch zwischen tetra- und diploiden Kernen etwas das gleiche Verhältnis besteht. Der Mehrbetrag von 4 n-Kernen gegenüber 2 n-Kernen scheint jedoch regelmäßig etwas höher zu sein. Während die Volumina von 8 n- zu 4 n-Ruhekernen sich wie 2,5 : 1 verhalten, liegt hier das Verhältnis 2,7 : 1 vor.

GEITLER hat eine große Anzahl Messungen an den Kernen der Appendixepidermis ausgeführt. Sie brachten jedoch keine Werte, aus denen sich eine Gesetzmäßigkeit im Wachstum ablesen ließe. Der Unterschied gegenüber meinen Angaben erklärt sich daraus, daß damals *alle* Kerne eines Areals gemessen wurden, während für die obigen Messungen bestimmte, in ihrem Entwicklungszustand vergleichbare Kerne ausgewählt wurden.

Ein Vergleich der Kerngröße einwandfrei diploider Kerne in den verschiedenen ausgewachsenen Geweben zeigt auch, wie weit eine Differenzierung allein durch Kernsaftvermehrung bzw. Kernsaftabnahme ohne Vermehrung der Chromosomen gehen kann. Es müssen also ausgewählte, deutbare Kerne aus entsprechenden Gewebestellen während bestimmter Stadien miteinander verglichen werden, um über das Verhältnis von Volumen und Chromosomenzahl ein Bild zu erhalten.

### Besprechung.

Die Untersuchungen an *Sauromatum guttatum* haben ergeben, daß auch im Pflanzenreich bei der normalen Gewebedifferenzierung ein Kernwachstum durch „innere Teilung“, also durch Polyploidie, erreicht werden kann. Das Auftreten von Polyploidie nach Einwirkung von Colchicin oder wachstumsfördernden Substanzen, wie sie z. B. LEVAN beschreibt, ist hier nur insofern von Interesse, als man den Ablauf der Teilung vergleichen kann.

Die Polyploidie wurde in den vorliegenden Untersuchungen erst beim Auftreten von Mitosen als solche erkannt. In den heranwachsenden Kernen konnten trotz fortlaufender Untersuchungen an *Spatha* und *Appendix* keine Beobachtungen gemacht werden, die den Zeitpunkt und die Entstehungsweise der verschiedenen Polyploidiestufen anzeigen. Diese Untersuchungen schließen aber andererseits aus, daß die Kerne durch Verschmelzung oder Restitutionskernbildung entstanden sind. Dagegen spricht auch eindeutig das ganze Verhalten der Chromosomen während der Prophase. Nie wäre zu verstehen, warum sich Gruppen von 4 bzw. 2 gleichartigen Chromosomen aus den Chromocentren herausdifferenzieren, wenn doch die homologen Chromosomen, wie die diploiden Mitosen zeigen, keinerlei Bindung untereinander aufweisen. Auch Bilder, wie sie die Weiterverfolgung der Mitosen großer Kerne ergeben, wären nicht verständlich. Da aber auch keine Endomitose, wie sie GEITLER (1939) für die Entstehung der polyploiden Kerne bei Wanzen aufzeigen konnte, beobachtet wurde, ist es wahrscheinlich, daß die Spaltung in Tochterchromosomen während des entspiralisierten Zustandes erfolgt.

Hier sind die Beobachtungen an *Spinacia* zu erwähnen, wo auch normalerweise bei der Ausdifferenzierung der Gewebe in der Wurzelspitze polyploide Teilungen auftreten (zuletzt GENTCHEFF und GUSTAFSSON). Denn auch hier muß nach allem die Spaltung in die zwei Tochterchromosomen in die Zeit des Ruhekerne oder spätestens in den Zeitpunkt vor seinem Übergang zur Prophase gelegt werden. Daß die Tochterchromosomen oft noch während der Metaphase die „Paarung“ zeigen, deuten die Autoren so, daß die Spaltung erst verhältnismäßig spät erfolgt ist, die Chromosomen sich also infolge der kurzen Zeit noch nicht voneinander getrennt haben. Bemerkenswert ist, daß, wie bei *Sauromatum*, nach Ablauf einer Teilung keine Bindung zwischen gleichartigen, ehemals beieinanderliegenden Chromosomen mehr vorhanden ist; auch in octoploiden Kernen gibt es keine Gruppen von mehr als zwei gleichen Chromosomen.

Bei *Sauromatum* erfolgt die Spaltung, wie erwähnt, im entspiralisierten Zustand. Infolge der Heterochromasie der Mittelstücke bleiben die Chromosomen beisammen; man sieht daher nur, daß die Chromo-

centren wachsen. Wäre kein Heterochromatin vorhanden, so würden die Chromosomen wohl wie ihre Enden auseinanderweichen und den ganzen Kernraum erfüllen. Dieser Art ist vielleicht der Vorgang, der zu den von JACHIMSKY beschriebenen großen Antipodenkernen von *Aconitum* führt, wo „ein fädiges Gerüst und auf den Fäden kleine Chromatinkügelchen“ vorhanden sind.

Ob die wachsenden Chromocentren, die YAMPOLSKY in den Kernen der Haarzellen von *Mercurialis annua* findet, auf ähnliche Weise zu erklären sind — daß nämlich die fast ganz aus Heterochromatin bestehenden Chromosomen infolge der Trägheit des Heterochromatins sich wenig trennen oder überhaupt in großen Klumpen beisammen bleiben — ist nicht zu beantworten, ehe diese Kerne einer feineren Untersuchung, z. B. mit Karminessigsäure, unterzogen worden sind. Übrigens entspricht dieses Heterochromatin offenbar dem Heterochromatin der Trabanten von *Sauromatum* und nicht dem mehr aufgelockerten Heterochromatin der proximalen Chromosomenstücke.

Die Höhe der beobachteten Polyploidie ist sehr gering im Vergleich zu der z. B. bei Wanzen vorkommenden, wo es Kerne gibt, die sicherlich 1023-ploid sind. Dies sind jedoch Kerne von Drüsenzellen, während die polyploiden Kerne, die bei *Sauromatum* festgestellt wurden, einem „gewöhnlichen“ Gewebe angehören. Aber auch bei *Sauromatum* und bei dem ihm auch im Kernbau verwandten *Arum maculatum* gibt es Kerne, deren Bau auf eine wesentlich höhere Polyploidie schließen läßt. Das sind die Kerne der Raphidenzellen und der Kern des Endospermhaustoriums von *Arum*, dem JACOBSON-PALEY schon 1920 eine Besprechung gewidmet hat<sup>1</sup>. Sie gibt, wie es auch für die Raphidenkerne von *Sauromatum* zutrifft, an, daß zu Beginn des Wachstums eine erhebliche Chromatinzunahme erfolgt, erst später scheint sich auch der Kernsaft zu vermehren. Der oft ungeheure Nucleolus und das spätere Auftreten von zahlreichen Nucleolen sprechen ebenfalls für eine ungleich höhere Stufe der Polyploidie. Diese Vermutung wird bekräftigt durch die Tatsache, daß sich der Schwesterkern des Haustorialkernes bei stetig klein bleibender Kerngröße oft teilt, wodurch das Endosperm gebildet wird. Die Raphidenkerne lassen sich in jungen Stadien, solange ihre Größe noch nicht die gewöhnlicher großer Kerne überschritten hat, sehr gut mit diesen vergleichen und zeigen dabei deutlich, daß sie viel chromatinreicher sind. Dies ist nebenbei wieder ein Beispiel dafür, auf welch verschiedene Weise gleich große Kerne gebaut sein können. Wenn man auch aus dem Bau dieser Kerne nicht die Höhe der Polyploidie ablesen kann und ein unmittelbarer Beweis durch die Chromosomenzählung in der Mitose nicht erreicht werden wird, so kann man nach den vorliegenden Beobachtungen doch sagen, daß auch bei Pflanzen in

<sup>1</sup> *Sauromatum* selbst konnte daraufhin noch nicht untersucht werden.



bestimmten Kernen hohe Polyploidie vorkommt. Daß dies gerade für ausgesprochene Drüsenzellen der Fall ist, unterstreicht die Vorstellungen über die aktive Teilnahme der Kerne am physiologischen Geschehen, wie sie die Beobachtungen aus dem Tierreich geweckt haben.

### Zusammenfassung.

1. In normalen, ausdifferenzierten Geweben von *Sauromatum guttatum* sind die herangewachsenen, großen Kerne polyploid. Es wurden tetraploide und octoploide Kerne in Teilung gesehen<sup>1</sup>, doch sind in ausgesprochenen Drüsenzellen auch viel höhere Stufen der Polyploidie wahrscheinlich.

2. Die Vervielfachung der Chromosomen erfolgt im entspiralisierten Zustand während des Wachstums der Ruhekerns durch „innere Teilung“.

3. Die Prophasen der polyploiden Kerne zeigen, daß auseinander entstandene Tochterchromosomen im Ruhekern beisammen liegen; während der Mitose weichen die Tochterchromosomen auseinander, bis in der Metaphase keine Gruppen mehr vorhanden sind.

4. Obwohl bei *Sauromatum* die Polyploidie ausschlaggebend für das echte Kernwachstum ist, spielen beim Zustandekommen der endgültigen Größe des Kernes noch das Wachstum der Chromosomen und die Kernsaftvermehrung eine Rolle.

Die Untersuchungen wurden auf Anregung und unter Leitung Herrn Prof. L. GEITLER im Botanischen Institut der Universität Wien bei Herrn Prof. F. KNOLL ausgeführt. Ihm und Herrn Prof. GEITLER im besonderen gilt mein Dank.

### Schriftenverzeichnis.

- Beasley, J. O.: Nuclear size in relation to meiosis. Bot. Gaz. 99 (1938). — Ernst, H.: Meiosis and crossing over. Z. Bot. 33 (1938). — Geitler, L.: Über das Wachstum der Chromozentrenkerne und zweierlei Heterochromatin bei Blütenpflanzen. Z. Zellforsch. 28 (1938). — Die Entstehung der polyploiden Somakerne der Heteropteren durch Chromosomenteilung ohne Kernteilung. Chromosoma 1 (1939). — Gentcheff, G. u. Gustafsson, A.: The double chromosome reproduction in *Spinacia* and its causes. Hereditas (Lund) 25 (1939). — Jachimsky, H.: Zur Zytologie der Antipodenkerne. Planta (Berl.) 26 (1937). — Jacobson-Paley, R.: Sur le Haustorium et la formation de l'Albumen dans *Arum maculatum*. Bull. Soc. bot. Gen. 12 (1920). — Levan, A.: The effect of colchicin on root mitosis in *Allium*. Hereditas (Lund) 24 (1938). — Cytological phenomena connected with the root swelling caused by growth substances. Hereditas (Lund) 25 (1939). — Yampolsky, C.: The cytology of the ovarian trichomes of *Mercurialis annua*. Cytologia 8 (1937).

<sup>1</sup> Anmerkung bei der Korrektur: Seither fand ich im Wundgewebe auch 16-ploide Mitosen.

## ENDOMITOSIS IN THE NURSE CELLS OF THE OVARY OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

By

THEOPHILUS S. PAINTER and ELIZABETH C. REINDORF

University of Texas.

With 18 figures in the text.

(Eingegangen am 20. August 1938.)

Some years ago the senior author noted a bewildering array of chromatic phenomena exhibited by the nurse cells in the ovaries of *Drosophila melanogaster*. In some nuclei there were dense aggregations of chromatin which resembled huge chromosomes, but there were no equatorial plate stages or other phases of division. Other nuclei showed a typical resting stage reticulum and especially striking in very large nuclei were the masses of fine granules surrounding a central coagulum which stained faintly with iron haematoxylin after Flemming-Hermann fixation. At the time there was no explanation at hand for these nuclear changes except that they might be somehow associated with the intense physiological activities of these cells.

Recently, and in part as a direct outcome of the question: Why are salivary chromosomes so large?, it has been shown by a number of workers that in tissues of insect larvae, which are destined to undergo histolysis during metamorphosis, growth is frequently accomplished by an increase in nuclear and cell size and accompanying this is the rhythmical growth and division of the chromosomes so that a high degree of polyploidy may result<sup>1</sup>. Aside from the multiple strand salivary chromosomes, the most striking examples of this behavior, perhaps, are found in the intestinal cells of the mosquito where BERGER (1938) reports the presence of as many as 192 chromosomes in a single nucleus, and in various tissues of *Gerris lateralis*, reported by GEITLER (1937). The latter form is especially favorable because the X chromosome in the male remains heteropycnotic in the resting stage so that the extent of the polyploidy can be determined by simply counting the number of Xs present in a nucleus. More recently, GEITLER (1939) has described the cycle of changes in the chromosomes which accompanies their reduplication and division. Briefly, the chromosomes parallel, in their behavior, the elements seen in ordinary mitosis up through what corresponds to a late prophase stage when a maximum degree of condensation and intensity of staining is observed. Then the chromosomes divide autonomously and uncoil again. There is no equatorial plate stage nor anaphase movement of the chromosomes and throughout the whole cycle the nuclear wall remains intact. The term "endomitosis" is proposed by GEITLER for this process.

<sup>1</sup> For reviews of the literature see COOPER (1938), or PAINTER (1939).

In 1938, BAUER published a preliminary note on the behavior of nurse cells in *Lucilia*, *Pollenia* and *Musca* in which he reported that in early growth stages there are haploid bundles of polytene-like chromosomes. During a certain phase of growth of the nuclei the individual chromatids separate and condense to form short and thick chromosomes.

In view of these recent developments it seemed highly probable that the nuclear phenomena observed years ago by one of us in the nurse cells of the ovary of the fruit fly were correlated with endomitotic cycles. This has proved to be the case and our observations are of interest because of the almost diagrammatic clearness of the whole process and the additional light which is thrown on the more general problems of chromosome structure and behavior.

*Material and methods.* The ovaries of newly hatched flies were used for study. After trying aceto-carmin whole mounts, which were not satisfactory because the cytoplasm absorbed so much dye, and various fixatives, Nawaschin's fluid was selected for preservation, paraffin sections were cut at  $15\mu$  and Feulgen's stain was employed exclusively.

*Nuclear size.* HERTWIG (1935) has measured the diameters and computed the volumes of 1837 nuclei of nurse cells of the ovary of *D. melanogaster* and plotted his results. The graph shows that these nuclei do not gradually increase in size but there are 6 or 7 sharp peaks which correspond to exact doublings of the nuclear volumes. He interpreted his findings to mean that there was a rhythmical growth and inner division of the nuclear constituents without a nuclear fission just as JACOB (1925), and others following him, have assumed for the tissues of many different animals.

We have not made an extensive study of nuclear volumes. Oogonial nuclei show an average diameter of about  $5\mu$  and the largest nurse cell nuclei measure about  $40\mu$  across. The volume of oogonial nuclei is  $65.4\mu^3$  and that of the largest nurse cells about  $33,493\mu^3$ . If we were to double the volume of the oogonial nuclei 8 times we would have  $33,164\mu^3$  which is in close agreement with the volume computed from actual measurements. On the basis of this evidence we may conclude that the largest nuclei are at least 512-ploid.

*Nuclear changes.* Nuclei with an average diameter of about  $8\mu$  exhibit the most striking series of changes in the form of the chromosomes. Some nuclei of this size show a typical reticulum (fig. 1) but usually all the chromatin, except a few wisps here and there, is restricted to 6 or, through coalescence, 5 aggregations which show various degrees of condensation and intensity of staining, beginning with ill defined strands in the reticulum, then most commonly flocculent masses of threads, and eventually very condensed and deeply staining elements which simulate huge metaphase chromosomes (figs. 2 to 6). These aggregations are often more or less connected by bridging processes. Figure 2 represents

an early phase of the condensation (or a late stage in the uncoiling), and it will be noted that each aggregation is made up of a number of loosely coiled threads (chromatids). The number of strands involved cannot be exactly determined but we estimate it to be about 8. Figure 3 is a more condensed stage showing the presence of 6 masses which can be approximately sorted into pairs. Two elements, labelled X, are distinctly heteropycnotic at one end, and four bundles show indications of a primary constriction near the center and are identified as the four large v-shaped autosomes of *D. melanogaster*. The very small fourth chromosomes have

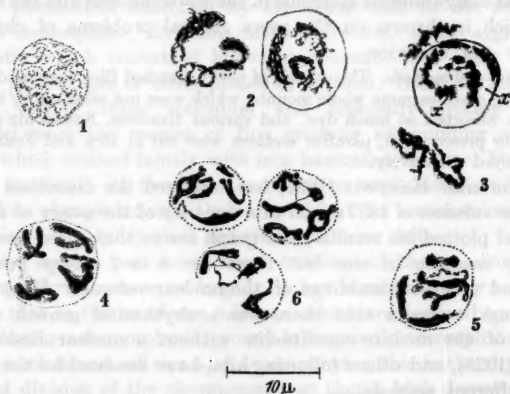


Fig. 1 to 6 represent various stages of the endomitotic cycle of nuclei with diameters averaging  $8 \mu$ . Fig. 1 is a resting stage. Fig. 2 and 3 show the multiple strand nature of the chromatid bundles. In both figures underlying bundles are drawn outside of the nuclear wall. Fig. 6 shows the maximum degree of contraction and staining.

not been identified but one often sees a few chromatic granules in these nuclei which probably represent these tiny chromosomes. Figures 4 and 5 are more condensed stages and there is less evidence here of the composite nature of these chromosome bundles. Figure 6 represents the maximum degree of contraction and intensity of staining. Three nuclei were present in the section from which this drawing was made and not all of the chromosomes masses show. It is evident, however, that the bundles of chromatids now appear bi-partite and there is little indication of the four strands which go to make up each half. Presumably the bi-partite form is the result of the initial telophase split. There is no conspicuous somatic pairing at any time in nuclei of this size nor is there a very close agreement in the shapes of these chromatid bundles.

From the above account it is clear that we have a series of stages which correspond to those of normal mitosis up to a very late prophase. The chromatids from previous division cycles remain closely adherent

and undergo as a unit a process of condensation or coiling and uncoiling with a corresponding increase or loss of chromaticity. In any given nucleus it is impossible to say which direction the coiling process is going, of course, but stages like figures 2 and 3 are far more common than the end stages of the series (figs. 1 or 6). There is no metaphase plate stage nor anaphase movement of the chromosomes and throughout the cycle the nuclear wall remains in-tact.

The volume of nuclei with diameters of  $8\mu$  is  $269\mu^3$ . Since oogonial nuclei have a volume of  $65.4\mu^3$  it would require two division cycles

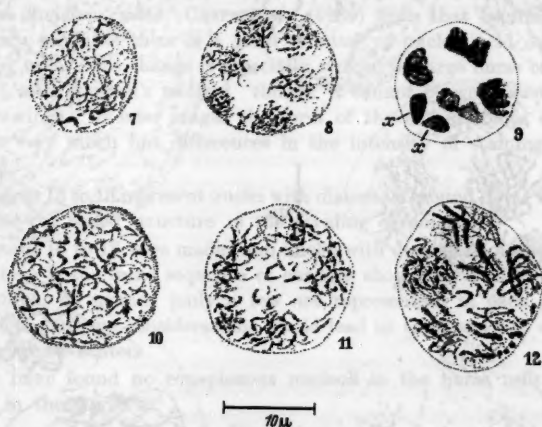


Fig. 7 to 12 show division cycles for nuclei with average diameters of  $13\mu$  and  $16\mu$ , respectively. In neither cycle is the association of chromatids as intimate as in earlier stages. In the more detailed figures only a part of the chromatids are drawn in.

to produce the observed volume which theoretically should be  $261\mu^3$ . Assuming a telophase split initially, there would be 8 strands in each chromosome bundle, an expectation which is confirmed by figure 2.

Figures 7 to 9 were made from nuclei with diameters measuring about  $13\mu$ , on the average. Here again there is evidence for a division cycle of the chromosomes but the association between the individual chromatids of the bundles is less intimate than in earlier cycles. Figure 7 shows the chromatin fairly evenly distributed about the nucleus but a comparison with figure 1 reveals that the material is in much coarser strands. In figure 8 we have the condensations of the chromatids into 6 aggregates, but this number is not constant, sometimes there are more numerous and smaller masses. Presumably the two main elements of a bundle, as seen in figure 6, have separated in the latter case. In each of the 6 masses of threads, shown in figure 8, one is able to follow for a short distance individual chromatids but it is not possible to make an exact count

of them. Figure 9 shows the maximum extent of chromatid contraction and intensity of staining. In the nucleus drawn the individual threads do not show well but the figure was made because one can identify the

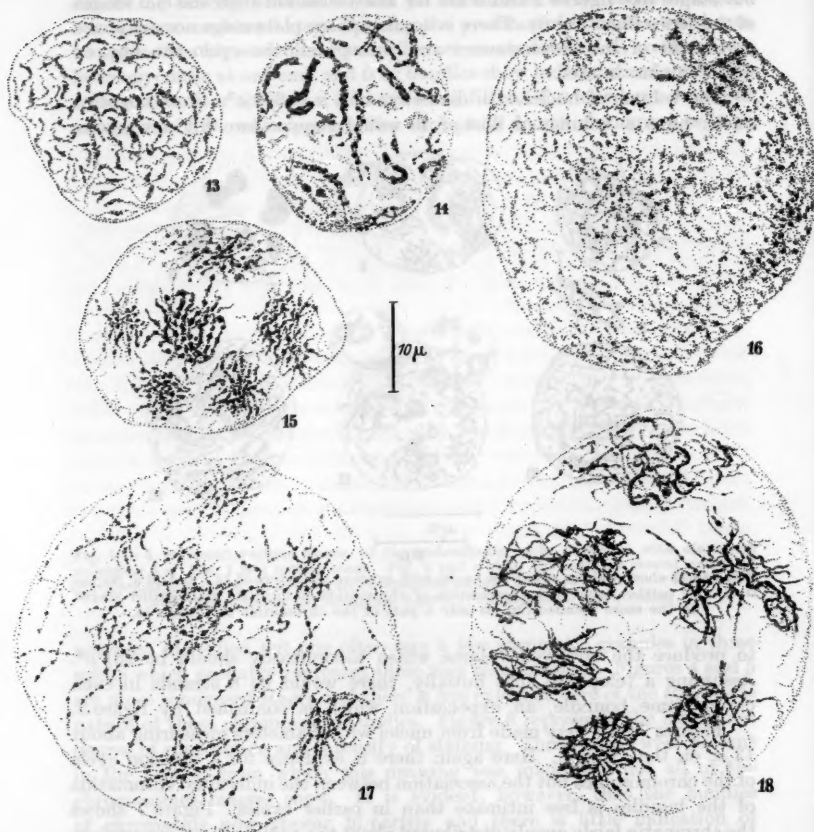


Fig. 13 to 15 show evidences for a division cycle in nuclei about  $22\ \mu$  in diameter.  
Fig. 16 to 18 were made from nuclei averaging  $40\ \mu$  in diameter.

2 X chromosome and 4 v-shaped elements corresponding to the pairs of second and third chromosomes of the fruit fly.

Taking an average diameter of  $13\ \mu$ , the nuclear volume would be  $1137\ \mu^3$ . Assuming that there had been 4 division cycles since the oogonial stage we would expect to find a volume of  $1046\ \mu^3$  and a maximum of



32 chromatids in each aggregation. It will be noted, however, from figure 8, that a few chromatic strands lie outside of the aggregates.

Figures 10 to 12 represent nuclei which have an average of about 16  $\mu$ . Figure 10 shows the chromatids rather evenly distributed about the nucleus but the individual elements show more plainly than in figures 7 and 1. In figure 11 the chromatids are beginning to be collected into 6 or more centers and in figure 12 there is a maximum degree of contraction, association, and intensity of staining.

As one examines larger nuclei than those described, there is evidence of more division cycles. CASPERSSON (1939) finds that beginning with the early prophase there is a great increase of nucleic acid content in dividing cells. This change is especially striking in large nurse cell nuclei stained with Feulgen's method, though it cannot be well illustrated in the drawings. In later stages the form of the chromosomes does not change very much but differences in the intensity of staining is very marked.

Figures 13 to 15 represent nuclei with diameters around 22  $\mu$ . Figure 14 indicates the coiled structure of the dividing chromatids.

Figures 16 to 18 were made from nuclei with diameters of about 40  $\mu$ . Here there is the same sequence of changes shown by smaller cells but the number of strands (only a few are represented) in each group is very high. Volume considerations would lead us to expect 512 elements in the largest centers.

We have found no conspicuous nucleoli in the nurse cells at any period in their growth.

#### Discussion.

The idea that concomitant with nuclear growth there is a rhythmical reduplication of the nuclear contents is not new to cytology. The evidence, prior to the salivary gland chromosome era, and first adduced by JACOB from nuclear volume considerations, was entirely indirect. Nor is the sporadic occurrence of polyploid nuclei in diploid tissues very uncommon in animals. But the formation of polyploid cells as a regular and normal growth process, in insect larval tissues, is a concept which has come into the foreground only recently. And the nuclear phenomena exhibited by the nurse cells of the *Drosophila* ovary is a very striking example of the same process extended over into the germinal tissue of the adult insect.

Our interest in this polyploidy, of course, centers about the reduplication process, and in the foregoing account we have presented the evidence which shows that the method is similar to that which obtains in normal mitosis except for the absence of the spindle mechanism and the sequelae of this. Because there is no spindle, there is no metaphase plate orientation of the chromosome bundles nor any anaphase movement and, in the absence of any mechanism for a wide separation, homologous

chromatids remain together. As a result during early and late prophase stages we have either discrete polytene chromosomes (fig. 6) or, later, loose felt-like masses of chromatids. We conclude from the evidence that during the growth of the nurse cells there must have been about 8 division cycles and that nuclei averaging  $40\ \mu$  in diameter are about 512-ploid.

While in general the behavior of the chromosomes in nurse cells is similar to the endomitotic cycle first described by GEITLER for tissues of *Gerris lateralis*, there are differences in details which should be pointed out. The most conspicuous difference is the tendency for the chromatids to associate together in discrete bundles during the prophase stages in nurse cells. GEITLER points out that in *Gerris* homologous chromosomes tend to lie in the same part of the nucleus but there is no indication of any attraction between homologues such as is found in the ovary of the fruit fly. The cause for the attraction between chromatids in the latter form is not entirely clear. We have noted that in earlier cycles the chromatids are most closely joined in the region of the centromere and it is possible that a delay in centromere cleavage is responsible for the close union seen in figure 6. In later cycles the chromatids are more scattered and their tendency to collect about centers may be an expression of the same force which causes the somatic pairing of chromosomes in Diptera.

The second most notable difference between *Drosophila* and *Gerris* is that in the latter form the chromosomes appear to be much more discrete than in the fruit fly and so in the latter we have a more complete parallelism between mitosis and endomitosis.

From a broader point of view there are two phases of cytology upon which our work has a bearing. The first is that our findings are in entire accord with the multiple strand concept of salivary gland chromosome structure. The bundles of chromatids in nurse cells differ from salivary chromosomes principally in the very close association of the elements in the latter and their great extension. In an article now in press the senior author has discussed the possible causes of this difference (PAINTER 1939). A second aspect is that the principle of the endomitotic cycle undoubtedly has a very wide application and will explain many cytological phenomena now obscure. Thus, from slides which Dr. BERGER sent the senior author, it is obvious that in the intestinal tract of the mosquito the increase in chromosome number is brought about by a series of changes essentially like that described for *Gerris* and the nurse cells of *Drosophila*. In all probability the variations in the staining of salivary chromosomes in a single gland are due to the fact that in different nuclei different phases of the endomitotic cycle are present. And undoubtedly many of the cases of polyploidy reported in the past and interpreted as being due to incomplete cytokinesis are really the sequelae of inner division cycles of the

chromosomes, without nuclear cleavage. The giant nuclei in malignant growths may have a similar origin.

#### Summary.

1. Nurse cells in the ovary of *D. melanogaster* show a range in nuclear diameters of from  $5\mu$  to  $40\mu$ . This indicates that the volume of the smallest nuclei must have been doubled 8 times to produce the largest nuclei which are therefore at least 512-ploid.

2. In nuclei with the same diameters we find evidence of a series of nuclear changes paralleling ordinary mitosis from a diffuse resting stage to a late prophase condition of the chromosomes. No equatorial plate is formed, nor is there an anaphase movement of the chromosomes, and throughout the cycle the nuclear wall remains in-tact. GEITLER's term "endomitosis" is used to describe this inner division cycle of the chromosomes.

3. A striking feature of the endomitotic cycles, in *Drosophila* ovaries, is the tendency for the chromatids to collect around separate centers in what correspond to early and late prophase stages. In the latter the association is most intimate.

4. In the earlier endomitotic cycles, the association between chromatids is extremely close, and in the late prophase dense chromosome-like aggregates of eight threads are found. In later cycles the association is less intimate.

5. Five division cycles are figured but from volume considerations, it is concluded that eight must occur to form the largest nuclei, if, as seems very probable, with each division cycle there is a doubling of the nuclear volume.

#### Literature.

- Bauer, H.: Die polyploide Natur der Riesenchromosomen. Naturwiss. 26, 77 (1938). — Berger, C. A.: Multiplication and reduction of somatic chromosome groups as a regular developmental process in the mosquito, *Culex pipiens*, Publ. -Nr. 496, Carnegie Inst. Wash., Contrib. to Embryol. 1938. — Caspersson, T.: Studies on the nucleic acid metabolism during the cell cycle. Arch. exper. Zellforsch. 22, 655—657 (1939). — Cooper, K. W.: Concerning the origin of polytene chromosomes in Diptera. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 24, 452—458 (1938). — Geitler, L.: Die Analyse des Kernbaus und der Kernteilung der Wasserläufer *Gerris lateralis* und *Gerris locustis* und die Somadifferenzierung. Z. Zellforsch. 26, 132 (1937). — Die Entstehung der polyploiden Somakerne der Heteropteren durch Chromosomenteilung ohne Kernteilung. Chromosoma (Berl.) 1, 1—22 (1939). — Hertwig, E.: Die Vielwertigkeit der Speicheldrüsenkerne und Chromosomen bei *Drosophila melanogaster*. Z. Abstammungslehre 70, 496—501 (1935). — Jacob, W.: Das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdoppelung ihres Volumens. Arch. Entw.mechan. 106, 124—192 (1925). — Painter, T. S.: A review of some recent studies of animal chromosomes. J. roy. microsc. Soc., in press (1939).

(Arbeiten der bayerischen Landessaatzuchtanstalt Weihenstephan.)

## EIN NEUER KARYOTYP BEI ROGGEN.

Von

G. KATTERMANN.

Mit 16 Textabbildungen (19 Einzelbildern).

(Eingegangen am 18. September 1939.)

Bei der karyologischen Untersuchung von Pflanzen des kurzstrohigen Weihenstephaner Winterroggens  $O_1$ , welcher durch langjährige Inzucht entstanden ist, fand ich mehrere, die sich durch ein besonderes Chromosomenpaar in den Anaphasestadien der 1. und 2. Reifeteilung der PMZ auszeichnen. Die individuelle Unterscheidung von Chromosomen in der Meiosis von *Secale cereale* bereitet im allgemeinen Schwierigkeiten. Bisher wurde die Aufmerksamkeit auf ein Chromosomenpaar hingelenkt (KATTERMANN 1937a, b), welches sich bei manchen Roggenpflanzen durch charakteristische, ziemlich tiefe Einschnürungen auszeichnet und welches ich als B-Chromosomenpaar bezeichnet habe. Es ist dasjenige Bivalente, welches (u. a.) genetisch die Behaarungsverhältnisse des Halmes bestimmt. Neuerliche Untersuchungen von Roggenpflanzen haben wieder gezeigt, daß dieses B-Paar bei *Secale* vor allem in der Doppelstäbchenform zu erkennen ist, daß dagegen in Fällen mit starker Chiasmaintensität (vorwiegend oder ausschließlich Ringbivalente) das B-Bivalente nicht immer sicher herauszufinden ist. In seiner interessanten Untersuchung von Inzuchtroggen hat LAMM (1937) Pflanzen erwähnt, die das B-Paar recht gut zeigen (auch hier als Doppelstäbchen).

In dem Bestreben, die Analyse des meiotischen Chromosomenbestandes vom Roggen weiter vorwärts zu treiben, wurde Material des ingezüchteten Roggens  $O_1$  herangezogen. Gleichzeitig lag den Untersuchungen die Frage zugrunde, ob sich in unserem Material in der Meiosis der Pollenmutterzellen sichtbar strukturelle Änderungen manifestiert haben. Wir machten nämlich, wie auch andere Forscher auf diesem Gebiete (NILSSON 1938), MÜNTZING 1939, die Beobachtung, daß die Fertilität bei vielen Pflanzen der Inzuchtfamilien zu wünschen übrigließ.

Überraschenderweise kam ich in beiden Punkten der Untersuchung sehr schnell zu einem Ergebnis. Während man sonst zur Chromosomenzählung den Metaphasestadien besonderes Augenmerk zuwendet, fahndete ich besonders auch nach Anaphase- und Telophasestadien der beiden Reifeteilungen. Dadurch war es möglich, den neuen Karyotyp zu entdecken.

Vom beschreibenden und vom genetischen Standpunkt aus haben sich drei Gruppen unterscheiden lassen, die im folgenden getrennt behandelt werden sollen; nämlich 1. der normale Karyotyp, 2. der abweichende, neuartige Karyotyp und 3. ein heterozygoter Zustand. Alle drei Gruppen sind hinsichtlich des Chromosomenbildes scharf unterschieden.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über das Gesamtergebnis. Pflanzen mit den gleichen Buchstaben sind aus den Körnern einer Ähre erwachsen. Die verschiedenen Ähren stammten aus verschiedenen Linien von  $O_1$ , die 1937 im Versuchsfeld Weihestephans angebaut waren. In der Tabelle bedeutet: ++ Normaltyp bzw. die besondere Chromosomenform fehlt. — — homozygoter neuer Karyotyp; es sind zwei abweichende Chromosomen als ein Paar homologer Chromosomen anwesend. + — heterozygoter Karyotyp; es sind ein normales Chromosom und ein verändertes Chromosom gleichzeitig im Kern anwesend.

Tabelle 1.

Pflanzen- bezeichnung	Karyotyp	Pflanzen- bezeichnung	Karyotyp	Pflanzen- bezeichnung	Karyotyp
a <sub>3</sub>	+ —	d <sub>3</sub>	++	i <sub>1</sub>	— —
a <sub>5</sub>	+ —	e <sub>2</sub>	++	i <sub>2</sub>	— —
b <sub>1</sub>	— —	f <sub>4</sub>	++	k <sub>3</sub>	— —
b <sub>2</sub>	— —	g <sub>4</sub>	— —	k <sub>4</sub>	— —
c <sub>3</sub>	— —	h <sub>1</sub>	++	k <sub>5</sub>	+ —
c <sub>4</sub>	— —	h <sub>2</sub>	+ —		
c <sub>5</sub>	+ —	h <sub>5</sub>	+ —		

### 1. Der normale Karyotyp.

Der als normal bezeichnete Karyotyp von *Secale cereale* hat sowohl in  $A_I$  als auch in  $A_{II}$  nur winkelig geknickte, also zweischenkelige oder



Abb. 1. Anaphase I in PMZ von Pflanze  $O_1 e_2$ , homozygot normal. Ein Bivalentes mit doppeltem Chiasma trennt sich verzögert.

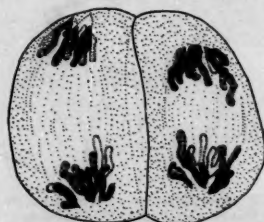


Abb. 2. Anaphase II in PMZ von Pflanze  $O_1 e_2$ , alle Chromosomen abgewinkelt, homozygot normal.

mehr oder weniger gebogene Chromosomen ohne Anhängsel (Abb. 1 und 2). Derselbe „normale“ Karyotyp hat offenbar auch bei den Untersuchungen

anderer Forscher vorgelegen, soweit ich dies nach ihren Abbildungen beurteilen kann, z. B. KIHARA (1924) Abb. 11b, MÜNTZING (1929) Abb. 4, TAKAGI (1935) Abb. 9, 12, 13, LAMM (1937) Abb. 11, 18, 19, 23, 29, 31, 32, 33, 34. Diese Aufzählung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Das Sat.-Chromosomenpaar von *Secale* ist in den Reifeteilungen der PMZ nicht zu erkennen. Aus der Analyse der somatischen Kernplatten ist aber das Vorhandensein von zwei Trabantenchromosomen bekannt (z. B. LEWITSKY 1931). Ich habe Kernplatten des  $O_1$ -Materials in Wurzelspitzen untersucht und gefunden, daß in allen Fällen auch bei  $O_1$  zwei Trabantenchromosomen vorhanden sind, unabhängig von der Zugehörigkeit der Pflanzen zu einem der hier beschriebenen Karyotypen. Von 19 bisher untersuchten Pflanzen gehören nur 4 dem sog. Normaltyp an, das sind 22%.

## 2. Der homozygote neue Karyotyp.

In der frühen bis mittleren Anaphase I zeigt ein Bivalentes in Doppelstäbchen- oder Ringform ein eigenartiges Verhalten. Bei der

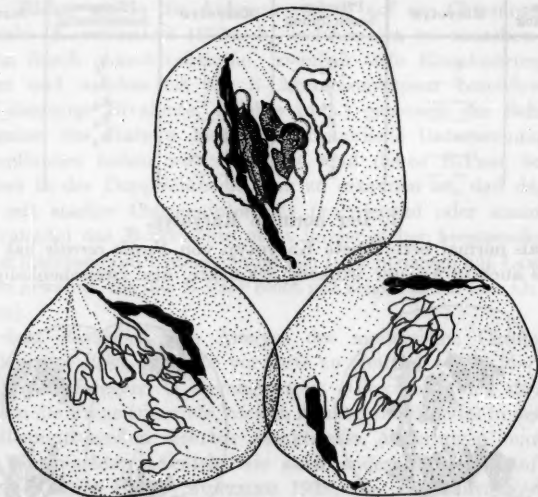


Abb. 3. Drei PMZ von Pflanze  $O_1 c_2$  in früher bis mittlerer Anaphase I. Zu beachten sind die schwarz gehaltenen T-Chromosomen. Links Ringform, oben Doppelstäbchen, rechts Pollage der getrennten Partner. Homozygot aberranter Karyotyp.

Bewegung nach den Polen der Spindelfigur bekommen die beiden Partner dieses Bivalenten zuerst geißelähnliche, dann aber satellitenartige Chromosomenanhängsel, die die Führung der Chromosomen nach den Polen übernehmen. Während alle übrigen Chromosomen in der Anaphase mehr



oder weniger winkelig gebogen sind und mit dem Winkelknie voraus zu den Polen der Teilungsfigur gleiten, wirkt der terminal ansetzende Zug jener Anhängsel an den abweichenden Chromosomen ausstreckend auf die Chromatiden. Dieser Vorgang ist anfangs nicht so ausgeprägt wie in der späten Anaphase und frühen Telophase, weil die Streckung der Chromosomen kontinuierlich mit dem Einsetzen der Anaphase beginnt. Bei Doppelstäbchenbivalenten wird die endgültige Stellung naturgemäß schneller erreicht als bei Ringbivalenten. Abb. 3 zeigt Zeichnungen von 3 Pollenmutterzellen der Pflanze O<sub>1</sub> c<sub>3</sub>, welche das Verhalten des betreffenden Bivalenten in der Ring- und in der Doppelstäbchenform kennzeichnen. Ein fortgeschrittenes Anaphasestadium der 1. Reifeteilung, eine Mikrophotographie, zeigt Abb. 4 in sehr schöner Weise. Ergänzend dazu stellen die Abb. 5 und 6 aus verschiedenen Zellen herausgezeichnete Bivalente in Ring- und Doppelstäbchenform dar, welche die Regelmäßigkeit des Vorganges und des Chromosomenbildes widerspiegeln. Nachdem ich einmal die Besonderheiten des neuen Karyotyps erfaßt hatte, war es ein leichtes, die zu untersuchenden Pflanzen dem neuen Karyotyp oder der Normalform zuzuteilen.

Die gestreckte Form der T-Chromosomen (so bezeichnet wegen der Anhängsel) und die terminalpolwärts gerichtete Lage der Anhängsel bedingt, daß diese Chromosomen mit jenen Anhängseln am weitesten an die Pole der Spindelfigur vorstoßen. Nicht selten ragen die

Chromosomenenden auch noch in der Telophase über die Masse der übrigen Chromosomen heraus, ein Bild, welches in Telophase II noch deutlicher wiederholt wird.

Ich möchte ganz besonders betonen, daß es unmöglich ist, das neue Chromosomenpaar in der 1. Metaphase als Bivalentes von den übrigen

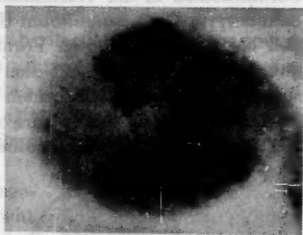


Abb. 4. Mikrophoto der A1 in einer PMZ der Pflanze O<sub>1</sub> g<sub>1</sub>. Deutliches Bild der T-Chromosomen.

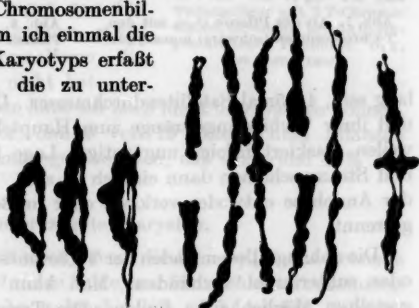


Abb. 5.

Abb. 6.

Abb. 5. T-Bivalente in Ringform aus verschiedenen Zellen. Frühe A1 von Pflanze O<sub>1</sub> c<sub>3</sub>.

Abb. 6. T-Bivalente in Doppelstäbchenform aus mehreren PMZ der Pflanzen O<sub>1</sub> c<sub>3</sub> (die ersten 5) und O<sub>1</sub> k<sub>1</sub>. Gleichzeitig verschiedene Chiasmaformen der anhängsellosen Schenkel der T-Chromosomen.

Bivalenten zu unterscheiden. Die Unterscheidungsmöglichkeit beginnt erst mit Eintritt der Anaphase.

Das Aussehen der Anhängsel variiert etwas je nach dem Blickfeld und auch von Präparat zu Präparat (je nach dem Quellungsgrad der Chromosomen in der Karminessigsäure und dem beim Präparieren der Schmierpräparate ausgeübten Druck auf die Zelle). Sicher ist aber, daß bei der homozygoten Form trabantenähnliche Köpfchen durch je zwei Chromatinstränge mit dem Hauptteil der Chromosomen verbunden sind, entsprechend den beiden Chromatiden jedes Chromosoms. Der Verbindungsstrang kann kurz sein, so daß die Anhängsel als kleine Köpfchen am Trägerchromosom sitzen, er kann aber auch ziemlich

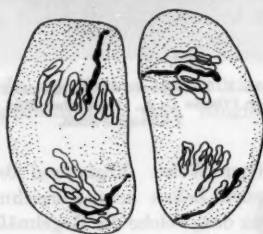


Abb. 7. AII der Pflanze O<sub>1</sub>c<sub>3</sub> mit den T-Chromosomen (schwarz) homozygot.

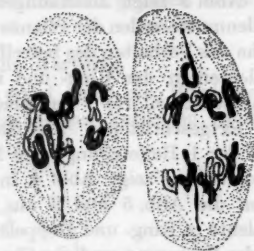


Abb. 8. Frühe Anaphase II in PMZ der Pflanze O<sub>1</sub>k<sub>4</sub>. Bezüglich der T-Chromosomen homozygot.

lang sein, 4—5mal Satellitendurchmesser. Die Paarigkeit der Anhängsel und ihrer Verbindungsstränge zum Hauptchromosom ist außerdem zuweilen maskiert infolge ungünstiger Lage im Gesichtsfeld. Anhängsel und Strang scheinen dann einfach zu sein. Die Köpfchen selbst sind in der Anaphase entweder verklebt oder in Berührung oder sie sind ganz getrennt.

Die anhängsellosen Enden der T-Chromosomen sind entweder terminal oder subterminal verbunden. Man kann die in Abb. 5 und 6 dargestellten Möglichkeiten finden. Die Trennung der Chromatiden gibt Hinweise auf die Art der Chiasmastellung. Man unterscheidet augenfällig 1. rein terminale Bindung; die Chromatiden trennen sich zu gleicher Zeit, 2. subterminale Bindung mit scheinbar ungleichen Schenkeln, das zuletzt getrennte Chromatidenpaar wird gedehnt und bekommt dadurch eine subterminal gelegene Einschnürung, die nur vorübergehend so tief und weit ist, 3. subterminale Bindung und Überkreuzung unter Einbeziehung beider Chromatidenpaare in das Chiasma. Dieser Zustand (Abb. 6 rechts) ist selten festzustellen. Die Art der Chiasmastellung ist vermutlich ein Ausdruck der crossing-over-Verhältnisse in den anhängselfreien Schenkeln der T-Chromosomen.

Nach den Beobachtungen in  $A_I$  war es von großem Interesse, auch die  $A_{II}$  zu untersuchen. Es zeigt sich, daß die T-Chromosomen in diesen Stadien das gleiche Verhalten zeigen. In der  $M_{II}$  ist ihre Auffindung nicht möglich, dafür aber in  $A_{II}$  ganz leicht (Abb. 7 und 8 und Mikrophotographie Abb. 9). Während die übrigen Chromosomen in der Anaphase II spitzwinkelförmig umgebogen sind und mit dem Winkelknie zuerst den Polen zustreben, strecken sich die T-Chromosomen meist unmittelbar nach ihrer Trennung so, daß ihre volle Längsachse in die Richtung der Spindelfasern fällt. Mit den Anhängseln voraus gleiten die Chromosomen zu den Spindelpolen. Oft erreichen sie den Pol zeitiger als alle übrigen Chromosomen der Teilungsfigur.

Es muß bezüglich Abb. 7 darauf hingewiesen werden, daß die Teilungsfiguren nicht ganz in natürlicher Lage sind, sondern daß sie beim Präparieren etwas verschoben wurden. Daher ist auch die gebogene Form der Spindeln nicht als etwa vorhandene Abnormalität zu bewerten.

Die extrem polare Lage der Enden der T-Chromosomen ist auch noch in der Telophase zu sehen. Die Enden ragen aus den telophasischen Chromosomenkappen etwas hervor, im Gegensatz zur Normalform, die diese herausragenden Enden nicht hat.

Die Teilungen im Pollenkorn habe ich noch nicht untersuchen können.

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß 9 von 19 untersuchten Pflanzen den neuartigen Karyotyp homozygot besitzen, das sind rund 47% des geprüften Materials.



Abb. 9. Anaphase-Telophase II in PMZ von *O. g.*. Die eine Teilungsfigur mit 2 T-Chromosomen, die andere bereits in vorgeschrittener Telophase. *O. g.* ist homozygot.

### 3. Der heterozygote Karyotyp.

Nachdem ich bei meinen Studien zuerst die homozygot abweichende Form, dann den Normaltyp gefunden hatte, war für mich das Vorkommen einer heterozygoten Form sehr wahrscheinlich. Ich möchte aber erwähnen, daß ich zwei solche Pflanzen zuerst übersehen hatte und sie der homozygoten Gruppe zurechnete, aus welchem Grunde, werden wir bald sehen. Ausschlaggebend wurde dann die Untersuchung der 2. Reifeteilung für das Erkennen der Heterozygoten. Bei den Beobachtungen der Anaphase I suchte ich nach solchen Stadien, die ein heteromorphes Paar haben, in der Meinung, daß es bei einer Paarung eines normalen und eines veränderten Partners (ihre Homologie vorausgesetzt) bei Fehlen von crossing-over in der 1. Reifeteilung ziemlich oft zu einer reduktionellen Verteilung der Partner kommen würde. Das war jedoch keineswegs der Fall. Im Gegenteil findet man in Anaphase I in ganz

überwiegendem Maße die in der Mikrophotographie der Abb. 10 festgehaltene äquationelle Verteilung der Chromatiden. Diese Abbildung ist folgendermaßen ganz einwandfrei und durch eine große Zahl Beobachtungen gesichert zu deuten. Jedes der beiden durch ihre Form ins Auge fallenden Chromosomen (das eine deutlich, das andere etwas verschwommen) besteht aus einem normalen winklig gebogenen Chromatid

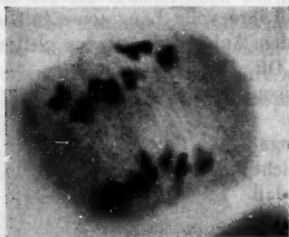


Abb. 10.

Abb. 10. Anaphase I in PMZ von  $O_1 c_1$  heterozygot. Jeder Partner des aberranten Bivalenten besteht aus einem normalen und einem T-Chromatid.

Äquationelle Teilung.



Abb. 11.

Abb. 11. Reduktionelle Teilung des aberranten Bivalenten in einer  $A_1$  der heterozygoten Pflanze  $O_1 a_1$ . Kommt sehr selten vor.

und aus einem abgeänderten gestreckten Chromatid. Der mit dem Anhängsel versehene Schenkel des letzteren ist zum Pol gerichtet, zeigt also das für ihn typische Verhalten. An der normalen Einschnürungsstelle bleiben beide Chromatiden verbunden. Dieses also ist das gewöhnliche Bild der Anaphase I. Es wurde dann auch bestätigt durch die Analyse der 2. Reifeteilung.

Außerdem kommt, ziemlich selten allerdings, die ursprünglich von mir als der

häufige Fall erwartete Verteilung der Chromosomen vor, derart, daß nach einem Pol zwei Chromatiden mit Anhängseln und nach dem anderen Pol zwei normale Chromatiden rücken, so wie dies für das wesentliche Bivalente die Abb. 11 zeigt.

Das Vorherrschen der äquationellen Verteilungsweise der T-Chromosomen war der Grund für eine vorübergehend falsche Einreihung von zwei Heterozygoten, bei welchen vorerst nur Anaphase I untersucht worden war. Daß bei den Partnern des heterozygoten T-Bivalenten sowie in Abb. 10 immer ein normales und ein verändertes Chromatid verbunden waren, habe ich, wie gesagt, erst nachträglich erkannt.

Um Zahlenwerte zu gewinnen, stellte ich die Häufigkeit der beiden Verteilungsmöglichkeiten bei  $O_1 a_5$  und  $O_1 c_5$  fest und fand die in Tabelle 2 wiedergegebenen Zahlen.

Zu dieser Statistik ist noch zu bemerken, daß möglicherweise der Fall der reduktionellen Verteilung um einen geringen Betrag zu kurz kam, weil ich wirklich nur einwandfreie Fälle verzeichnet habe. Die Zellen, für die ich keine klare Entscheidung über die Verteilungsart fällen konnte — es waren nur einzelne —, gehören zum größeren Teil vielleicht zu Fall 2 (reduktionelle Verteilung). Dies ist vor allem nach Befunden in der 2. Reifeteilung zu vermuten.

Die 2. Reifeteilung brachte weitere außerordentlich interessante Aufschlüsse über die T-Chromosomen. Wie erwähnt, wurden Beobachtungen über die 2. Reifeteilung ausschlaggebend für die Erkennung der Heterozygoten. Ich fand, daß ein gewisser Teil der Anaphasestadien zwei normale und zwei veränderte Chromosomen hatte. Solche Pflanzen mußten also heterozygot sein.

Die Verteilung der Chromosomen in  $A_{II}$  entspricht den Verhältnissen in Anaphase I. Es ist klar, daß die gewöhnliche Verteilung in  $A_I$  in der  $A_{II}$  dazu führt, daß jede Teilungsfigur ein normales und ein verändertes Chromosom mit Anhängsel besitzen muß. Hierdurch wird die Reduktion des Chromosomenbestandes in der 2. Reifeteilung herbeigeführt. Die zweite, seltene Möglichkeit führt dazu, daß

Tabelle 2.

Bezeichnung	Präparat	Häufigkeit			
		äquationell reell	%	reduktionell reell	%
$O_1 a_5$	VII	37	97,4	1	2,6
	VIII	22	95,7	1	4,3
	IX	96	98,9	1	1,1
	X	44	95,7	2	4,3
	XI	(2)	66,0	(1)	(33,0)
	XV	46	100,0	0	0
	XVI	103	100,0	0	0
$O_1 c_5$	$\Sigma$	350	98,3	6	1,7
	II	18	100	0	0
	III	26	92,9	2	7,1
	$\Sigma$	44	95,7	2	4,3

eine Teilungsfigur die beiden veränderten Chromosomen und die andere Teilungsfigur die normalen Chromosomen hat. Damit kommt die 2. Reifeteilung einer Äquationsteilung gleich. Beide Möglichkeiten sind verwirklicht. Außerdem aber wurden noch weitere Verteilungsarten offenbar, die nicht anders als durch crossing-over zwischen ungleich gepaarten, aber homologen Partnern zu erklären sind. Ich werde in der Schlußbesprechung auf diese Frage ausführlich eingehen. Die mikroskopisch gefundenen Fälle sind mit in die Tabelle 3 (S. 293) eingetragen. Für die Verteilungsarten sind als Kopf der Tabelle Schemata aufgestellt worden.

In der Abb. 12 sind einige Verteilungsarten festgehalten. Was im Bild nicht wiedergegeben ist, in den Tabellen aber verzeichnet wurde, konnte zeichnerisch nicht dargestellt werden wegen ungünstiger Lage der Teilungsfiguren. Trotzdem besteht kein Zweifel an der Richtigkeit jener Beobachtungen.

Es sei darauf hingewiesen, daß bei den Verteilungsmöglichkeiten ohne vorausgegangenes crossing-over äquationelle Verteilung in Anaphase II, auf reduktionelle in  $A_I$  und umgekehrt reduktionelle Verteilung in  $A_{II}$  auf äquationelle in  $A_I$  zurückzuführen sind. Wie man bei Vergleich der Angaben für  $A_I$  und  $A_{II}$  sieht, besteht eine sinngemäße Beziehung. Wenn die Statistik der 1. Reifeteilung durchschnittlich bei  $O_1 c_5$  4,3% reduktionelle Verteilung aufweist, so steht damit 5,5% äquationelle Verteilung in Zellen ohne crossing-over zuzüglich 1,9% äquationeller Teilungen in Zellen mit crossing-over in brauchbarer Übereinstimmung.

Das gleiche gilt für  $O_1 a_5$  mit den Zahlen 1,7% für  $A_I$  und 4,5% für  $A_{II}$ . Auf die Tatsache, daß in Reifeteilung I unter den zweifelhaften Teilungsfiguren vor allem reduktionelle Verteilungsweise versteckt sein kann, wurde bereits hingewiesen. Damit ist der Unterschied zwischen  $A_I$  und  $A_{II}$  wohl aufzuklären. In der Gegenprobe stehen sich folgende Werte gegenüber:  $O_1 a_5$  hatte in  $A_I$  98,3% reduktionelle Verteilung im Vergleich

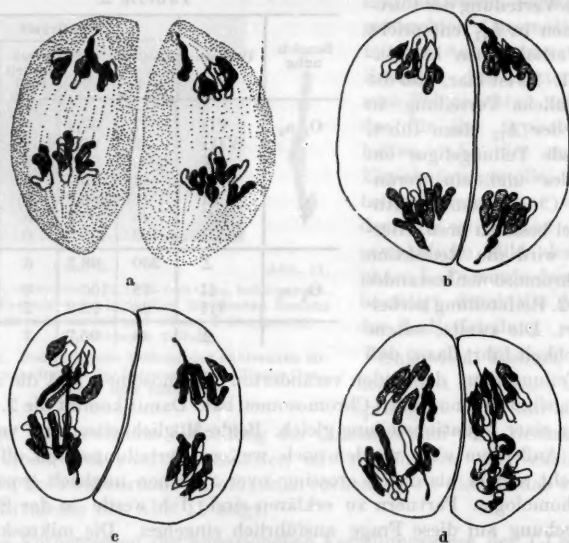


Abb. 12 a—d. Anaphase II in heterozygoten Pflanzen. a Reduktionelle Verteilung bei  $O_1 a_5$ . b Äquationelle Verteilung bei  $O_1 a_5$ , seltener Fall. c Dicentrisches Chromatid nach crossing-over in einer Teilungsfigur bei  $O_1 c_5$ . d Dicentrische Chromatiden in beiden Anaphasefiguren bei  $O_1 c_5$ .

zu 85,4% äquationeller Stadien in  $A_{II}$ . Für  $O_1 c_5$  lauten die entsprechenden Zahlen 95,7% gegen 86,6%. Auch diese Zahlen sind gut. Übrigens ist der Vergleich noch deswegen nicht ganz fehlerfrei, weil für die Statistik der  $A_I$  die zweifelhaften und nicht einzuordnenden Stadien prozentual nicht erfaßt sind. Es kommt hier jedoch auf die Größenordnungen an, und diese stimmen genügend überein.








Als wesentlicher Gesichtspunkt aus dieser Erörterung schält sich die Feststellung heraus, daß äquationelle bzw. reduktionelle Verteilung in Reifeteilung I nicht zufallsbedingt sein können, sondern daß die äquationelle Verteilung ganz gewaltig bevorzugt ist. Aus dieser Tatsache läßt sich weiter als sehr wahrscheinlich ableiten, daß das Verteilungsverhältnis bereits in der Prophase vorbereitet wurde, naheliegender-



weise mit Beginn des Diplonemas, in welchem nach allgemeiner Ansicht die Trennung der Chromatiden in Paare erfolgt.

Bei der Statistik der  $A_{II}$  enthält die Reihe der in ihrer Einordnung fraglichen und abnormen Fälle einige Zellen, in welchen der Zustand

Tabelle 3.

	$O_1 a_2$		$O_1 c_2$				$\Sigma$	%
	Pr. XVI.	%	IV	V	VI	VII		
 Ohne crossing-over	72	36,2	3	—	26	56	85	33,3
 Reduktionell	88	44,2	—	—	17	53	70	27,5
$\Sigma$	180	80,4	3	—	43	109	155	60,8
 Äquationell	9	4,5	1	1	1	11	14	5,5
? und sonst abnorm	20	10,0	—	—	5	10	15	5,9
 Nach crossing-over	10	5	2	—	21	38	61	23,9
 Reduktionell	—	—	—	—	—	4	4	1,5
 Äquationell	—	—	—	—	2	3	5	1,9
 —	—	—	—	—	—	1	1	0,4
$\Sigma$	199	11,1	—	—	—	25	255	1090

hinsichtlich der T-Chromosomen nicht klar lag. Es waren dies bei  $O_1 c_2$  3 Zellen, in welchen anscheinend das eine T-Chromosom fragmentiert war, und zwar in allen 3 Fällen in gleicher Weise in ein sehr kleines Fragment und einen größeren Partner. Außerdem war noch ein unverändertes T-Chromosom in den Teilungsfiguren zu sehen. In einer

weiteren Zelle lag ein T-Chromosom in der Teilungsfigur abseits; es war außerdem überzählig, d. h. jede Polgruppe bestand schon aus 7 Chromosomen. Das T-Chromosom lag seitlich von einer dieser Gruppen. Die Teilungsfigur hatte also 15 statt 14 Chromosomen. Die zugehörige andere Teilungsfigur ließ sich nicht zählen, hätte vermutlich aber 1 Chromosom zu wenig. Zu den abnormen Zellen wurde auch noch eine gerechnet, die ein sonst nirgends beobachtetes Fragment enthielt.

Bei der Darstellung der zytologischen Ergebnisse habe ich außerdem Störungen in der I. Reifeteilung, insbesondere Nichtpaarung, Fälle mit Fragmentierung, Brücken und Fragmentbildung bei normalen Pflanzen und den hier beschriebenen Homozygoten und Heterozygoten (da nicht T-Chromosomen beteiligt waren) unberücksichtigt gelassen, ebenso Brückenbildung durch dicentrische Chromatiden in A<sub>II</sub>, die bei einigen Pflanzen aber anderen Chromosomen sehr häufig ist.

Nach Tabelle 1 waren von 19 Pflanzen 6 heterozygot, das sind rund 32%.

Die Mitteilung dieser Unregelmäßigkeiten soll einer späteren Veröffentlichung vorbehalten bleiben.

#### Deutung der Ergebnisse.

Die Satellitenähnlichkeit der Anhängsel der T-Chromosomen läßt die Frage auftauchen, ob es sich bei ihnen um die aus dem somatischen Chromosomensatz von *Secale cereale* her bekannten beiden Trabantenchromosomen des Diploidsatzes handelt. Dies zu klären, war mir bis jetzt unmöglich. Ausgeschlossen ist die Identität beider Chromosomentypen (Sat.-Chromosomen und T-Chromosomen) nicht. Allerdings steht dieser Möglichkeit die Beobachtung entgegen, daß die Trabanten der T-Chromosomen in der Anaphase zum Pol vorauswandern, während bei den eigentlichen Sat.-Chromosomen des Roggens das mit dem Centromer ausgestattete Chromosomenknie am weitesten polwärts liegt, wenigstens in somatischen Teilungen. Leider läßt sich bei den Normalpflanzen unseres Materials das Satellitenchromosom in der Meiosis nicht erkennen. Im somatischen Satz ist es aber vorhanden und sowohl in der Metaphase als auch in der Anaphase sind die Satelliten zu erkennen. Da die Satelliten terminal an den Trägerchromosomen angeheftet sind, müßten sie in einer normalen meiotischen Anaphasefigur mit ihren winkelig abgebogenen Chromosomen äquatorwärts zu suchen sein. Leider ist in unserem Material alles Suchen erfolglos. Die Satelliten sind anscheinend infolge einer hochgradigen Zusammenziehung der meiotischen Chromosomen ununterscheidbar mit ihren Trägerchromosomen verbunden.

Es scheint aber Pflanzen zu geben oder vielleicht Fixierungsverhältnisse, bei welchen die Satelliten auch in der Meiosis zu erkennen sind (z. B. LAMM, Abb. 91). Sie liegen hier, wie erwartet, äquatorwärts.

Das eigenartige und mit aller Regelmäßigkeit wiederkehrende Verhalten der T-Chromosomen in den heterozygoten und homozygoten neuen Karyotypen ist bestimmt nichts Zufälliges. Die Frage nach der Ursache des Unterschiedes der T-Chromosomen im Vergleich zu den „normalen“ homologen Partnern wäre jetzt zu erörtern. Die für die Bewegung der Chromosomen verantwortlichen Centromeren sind bei *Secale* (von Formen mit aberrantem Chromosomensatz abgesehen) nach LEWITSKY (1931) und HASEGAWA (1934) median oder submedian lokalisiert. Letzteres trifft z. B. für das Sat.-Chromosomenpaar zu. In der normalen somatischen Anaphase liegen die Trabanten äquatorwärts, nicht polwärts, was ich selbst gesehen habe. Die Anaphase der neuen homozygoten und heterozygoten Karyotypen bleibt noch zu untersuchen. Es ist offensichtlich, daß, wie ja allgemein bekannt ist, die Bewegung der Chromosomen bei der Normalform nur von den bei Roggen an medianen oder submedianen Einschnürungsstellen der Chromosomen befindlichen Centromeren beherrscht wird, während die Trabanten in dieser Beziehung völlig passiv mitgezogen werden. Das Verhalten der T-Chromosomen in der Meiosis scheint dieser Sachlage zu widersprechen. Hier übernimmt das Anhängsel, der Trabant, die Führung des Chromosoms und zieht es mit seiner ganzen Länge nach, während die Stelle, an der sich eigentlich das Centromer befinden müßte, inaktiv zu sein scheint. Ich komme zu folgender Ansicht: Daß die Trabanten einfach zu Centromeren geworden sind, kommt nicht in Frage. Wenn sich die Anhängsel der T-Chromosomen oder Stellen in ihnen trotzdem so verhalten wie sonst nur Centromeren, während die gewöhnlich für die Centromeren vorgesehene Stelle inaktiv ist, so kann dies nur auf eine Translokation des Centromers zurückzuführen sein.

Ich nehme deshalb an, daß die T-Chromosomen durch eine spontane Translokation entstanden sind, bei welcher das ursprünglich submedian gelegene Centromer terminal verlagert wurde. Ob gleichzeitig mit dem Centromer auch andere Loci ihren Platz wechselten, bleibe dahingestellt. Es ist möglich, aber nicht unbedingt notwendig.

Da die T-Chromosomen ausgesprochene Trabanten haben, liegt der schon oben ausgesprochene Gedanke nahe, sie mit den in jeder Normalform und somatisch auch in den Translokationsformen von Grund aus vorhandenen beiden Sat.-Chromosomen zu identifizieren. Die T-Chromosomen wären dann durch einen Translokationsvorgang veränderte Sat.-Chromosomen. Das Centromer hätte den alten Platz in der Mitte des Chromosoms mit einem neuen Platz am Chromosomenende vertauscht. Im Zusammenhang damit wäre das morphologische Bild der T-Chromosomen in den Anaphasestadien verständlich. Bei unveränderten Sat.-Chromosomen sind die Trabanten in den Reifeteilungen nicht sichtbar. Das Sichtbarwerden des Trabanten bei der Translokationsform könnte vielleicht auf einem Zug der terminal in die Trabanten

verlagerten Centromeren beruhen, durch welchen die Ablösung der Satelliten von den Trägerchromosomen bewirkt wird. In der Normalform besteht diese Zugwirkung in der Anaphase nicht, weil das Centromer median liegt.

Würde es sich bei den Trabanten der T-Chromosomen um vollkommene Neubildungen handeln, dann müßte man bei der homozygoten Translokationsform im somatischen Chromosomensatz neben zwei für *Secale cereale* sonst eigentümlichen Sat.-Chromosomen noch zwei weitere

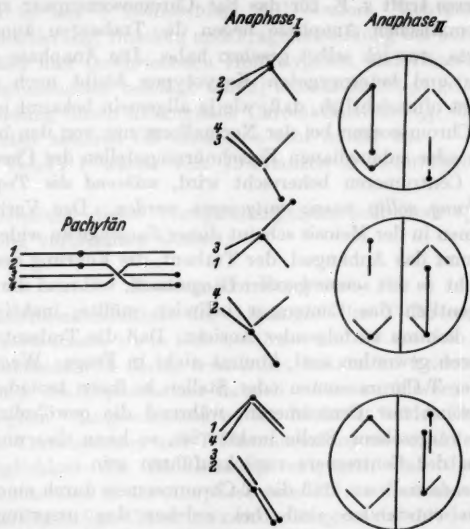


Abb. 13. Schema der Chromatidverteilung in AI und AII nach einfachem crossing-over bei einer Translokationsheterozygoten. Die Punkte entsprechen Centromeren. Acentrische Chromatiden mit Lücke. (Einschnürung ohne Centromer.)

Sat.-Chromosomen finden, also insgesamt vier Chromosomen mit Trabanten. Bei heterozygoten Pflanzen müßten drei solche Chromosomen vorhanden sein. Das ist jedoch nicht der Fall. Bei zahlreichen Pflanzen von  $O_1$  „Normalform“ und „Translokationsform“ homozygot und heterozygot sind stets nur zwei Trabantenchromosomen in somatischen Kernplattenvorhanden. Auch diese Tatsache spricht mehr für die Identität der Sat.- und T-Chromosomen als gegen sie. Der Unterschied beider besteht strukturell durch die geänderte Lage des Centromers bei der Translokationsform. Diese Überlegungen sind Indizien, aber noch keine Beweise. Weitere Beobachtungen sind deshalb notwendig.

Wenn die T-Chromosomen tatsächlich strukturell veränderte Sat.-Chromosomen sind, löst sich automatisch eine zweite Frage, nämlich

diejenige nach einer etwaigen Identität der T- mit den B-Chromosomen. Die B-Chromosomen sind sicher verschieden von den Sat.-Chromosomen. Bestätigt sich die Identität der T-Chromosomen und der Sat.-Chromosomen, dann ist gleichzeitig auch bewiesen, daß T- und B-Chromosom verschiedene Homologe des Roggensatzes sind. Rein aus morphologischen Beobachtungen konnte diese Frage nicht entschieden werden. Ich muß sie also vorläufig noch offen lassen.

Mit unserer Annahme, daß es sich bei dem aberranten Karyotyp um eine Translokationsform handelt, steht das Verhalten der heterozygoten Form in Einklang. Dicentrische Chromatiden, wie sie in vielen Anaphasestadien der Reifeteilung II nachzuweisen sind, können erklärt werden als Produkte einfachen und doppelten crossing-overs zwischen

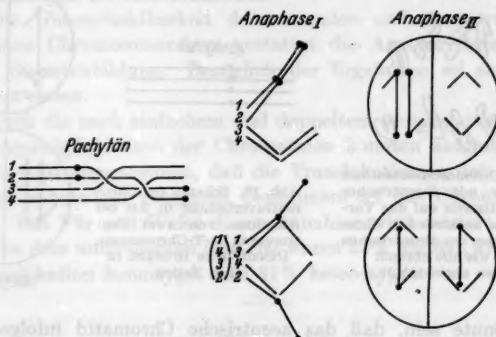


Abb. 14. Schema der Chromatidverteilung in AI und AII nach doppeltem crossing-over bei einer Translokationsheterozygoten.

dem Normalchromosom und dem homologen durch Translokation veränderten Partner. Die Beziehungen zwischen crossing-over, Anaphase I und Anaphase II stellen die schematischen Darstellungen in Abb. 13 und 14 vor Augen.

Dabei ergibt sich allerdings ein Einwand, den zu entkräften nicht einfach ist, außer durch neue Annahmen. Es ist folgender: Bei einfachem crossing-over zwischen einem normalen und einem translozierten Chromosom müßte auch ein acentrisches Chromatid gebildet werden. Da sich acentrische Chromosomen, z. B. bei Inversionsheterozygoten sehr oft wie Nachzügler verhalten und durch das Fehlen des Centromers die Chromosomenbewegungen nicht mitmachen, sollte man in unserem Fall ein ähnliches Verhalten erwarten. Ich habe aber bei der Prüfung der großen Zahl Anaphasestadien II mit dicentrischen Brücken von acentrischen Chromosomen nichts gemerkt (Abb. 15!). Alle Chromosomen in den Teilungsfiguren außer jenen Brücken haben eine normale Bewegungsfähigkeit.

Ich sehe drei Erklärungsmöglichkeiten für diese Tatsache: 1. Die nach meinem Erklärungsversuch bei crossing-over entstehenden „acentrischen“ Chromatiden sind gar nicht ohne Centromer. Wenn das der Fall wäre, müßten die T-Chromosomen zwei Centromeren haben, eines an der gewöhnlichen Stelle, das andere terminal. Konsequenterweise würde zur Erklärung eines solchen Chromosomenbaues eine einfache Translokation nicht genügen, sondern es müßte zusätzlich eine Duplikation eines Centromers angenommen werden, sei es nun des homologen oder eines nichthomologen translozierten Centromers. Eigenartig würde bei Bestehen dieses Falles sein, daß eigentlich nur das terminale Centromer bei den T-Chromosomen die Bewegung beherrscht.

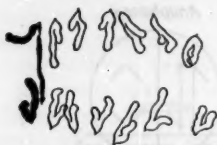


Abb. 15. Der Chromosomenbestand einer AII-Figur mit dicentrischer Brücke. Kein Hinweis auf das Vorhandensein eines acentrischen Chromatids. Der Partner des dicentrischen Chromatids wie alle übrigen Chromosomen abgewinkelt.



Abb. 16. Schema der Chromatidverteilung in AII bei Annahme von zwei Centromeren im T-Chromosom. Dicentrische Brücken in allen Zellen.



Anaphase<sub>II</sub>

2. Es könnte sein, daß das acentrische Chromatid infolge seiner Größe — es hat mikroskopisch die Länge eines gewöhnlichen Chromosoms — die anaphasische Bewegung mitmacht. Ein solches Verhalten wäre allerdings ungewohnt.

3. Die Translokation, die zur Entstehung der T-Chromosomen führte, war keine totale, sondern nur eine partielle, d. h. ein Teil des Centromers blieb an seinem alten Platz, der andere Teil wurde transloziert. Auch ein solcher Vorgang käme praktisch einer Duplikation der Centromeren gleich. Daß die Centromeren nicht unteilbar sind, beweist jede Kernteilung. Vorhandene Centromeren haben die Fähigkeit, sich zu vervielfältigen, genau wie jedes Gen oder jedes Chromomer. Ganz absurd wäre also eine solche Annahme nicht. Was mich aber an ihr stört, ist, daß sich das Vorhandensein von zwei Centromeren in den T-Chromosomen nicht deutlicher auswirken sollte. Ich würde in einem solchen Fall mindestens in Reifeteilung II das Vorkommen dicentrischer Brücken in fast allen Teilungsfiguren erwartet haben (nach Schema 2 in Abb. 16), ganz gleich ob crossing-over stattfindet oder nicht. Unsere Beobachtungen sprechen keineswegs für diese Annahme. Deshalb bleibe ich zunächst bei der zuerst dargelegten Deutung.



Eine Entscheidung, was endgültig richtig ist, wird vielleicht nach weiteren Untersuchungen möglich sein.

### Zusammenfassung.

1. Bei Inzuchtroggen Weihenstephaner O<sub>1</sub> (*Secale cereale*) wurden bei der Untersuchung von 19 Pflanzen aus verschiedenen Linien drei karyologisch verschiedene Formen gefunden. Es handelt sich um einen Normaltyp, eine homozygote und eine heterozygote Translokationsform.

2. Die Translokationsformen unterscheiden sich vom Normaltyp durch das Auftreten eines bisher bei Roggen nicht beobachteten Chromosomentypes in Anaphase I und Anaphase II der Meiosis in PMZ, bei der homozygoten Form zweifach, bei der heterozygoten Form in Verbindung mit dem homologen Normalchromosom.

3. Die Unterscheidbarkeit der normalen und der strukturell abweichenden Chromosomenform gestattet die Analyse ihrer Verteilung bei der Gametenbildung. Bezüglich der Ergebnisse sei auf die Arbeit selbst verwiesen.

4. Auch die nach einfachem und doppeltem crossing-over erwarteten Verteilungsmöglichkeiten der Chromatiden konnten aufgezeigt werden.

5. Es wird angenommen, daß die Translokation in der Verlagerung des sonst submedian gelegenen Centromers an das Chromosomenende besteht. Das Für und Wider dieser Annahme wird erörtert.

6. Von dem untersuchten Material waren 22% normal, 47% bezüglich der Translokation homozygot und 31% heterozygot.

### Schriftenverzeichnis.

- Hasegawa, N.: A cytological study on 8-chromosome rye. *Cytologia* 6, 68—77 (1934). — Kattermann, G.: Chromosomenuntersuchungen bei halmbehaarten Stämmen aus Weizen-Roggenbastardierung. *Z. J. A. V.* 73, 1—48 (1937a). — Das Verhalten des Chromosoms für Behaarung roggenbehaarter Nachkommen aus Weizen-Roggenbastardierung in neuen Kreuzungen mit Roggen und Weizen. *Z. J. A. V.* 74, 1—16 (1937b). — Kihara, H.: Cytologische und genetische Studien bei wichtigen Getreidearten, mit besonderer Rücksicht auf das Verhalten der Chromosomen und die Sterilität in den Bastarden. *Mém. Coll. Sci. Kyoto imp. Univ.* 1, 13 (1924). — Lamm, R.: Cytogenetical studies on inbred rye. *Hereditas* (Lund) 22, 217—240 (1937). — Lewitsky, G. A.: The morphology of the chromosomes. *Bull. appl. Bot., Gen. and Plant-Breed* 17, Nr 1, 103—169 sp. 118—123 (1931). — Müntzing, A.: Chromosomenaberrationen bei Pflanzen und ihre genetische Wirkung. *Ber. 13. Jahresvers. Ges. dtsch. Vererb.* 1939, 323—350. — Nilsson, H.: Eine Prüfung der Wege und Theorien der Inzucht. *Hereditas* (Lund) 23, 236—256 (1937). — Takagi, F.: Karyogenetical studies on rye. I. A trisomic plant. *Cytologia* 6, 496—501 (1935).

(Aus dem Zoologischen Institut der Universität Halle a. S.)

## ÜBER DIE HÄUFIGKEIT MEHRFACHER CHIASMEN UND IHRE BEZIEHUNG ZU EINER GERICHTETEN CHIASMABILDUNG<sup>1</sup>.

Von

CHARLOTTE BOOST und WILHELM LUDWIG.

(Eingegangen am 21. Oktober 1939.)

Für alle Fragen der Chiasmabildung ist wesentlich zu wissen, ob sich innerhalb einer Tetrade (bzw. eines Tetradenschenkels) die einzelnen Chiasmen in bestimmter Richtung hintereinander anlegen oder nicht. Ersterer Fall würde z. B. bedeuten, daß das zeitlich erste Chiasma stets relativ nahe dem Centromer (der SFA) entsteht, das zeitlich zweite distaler und das zeitlich letzte am nächsten dem freien Ende; doch ist auch die umgekehrte Richtung (distal → SFA) möglich und auch vertreten worden (z. B. KIKKAWA 1933/34). Von den wichtigsten gegen teiligen Fällen wäre der eine der, daß sich die Chiasmen einer Tetrade fast gleichzeitig ausbilden, der andere, daß sie zwar zeitlich hintereinander entstehen, daß aber ein zeitlich späteres Chiasma zwischen 2 schon angelegte Chiasmen fallen kann.

*Zytologische Indizien* zum Entscheid dieser Frage gibt es nur wenig, und etliche von ihnen sind Zufallsbeobachtungen. So konnte man z. B. wahrnehmen, daß die Chromosomenpaarung oftmals beim Centromer beginnt (aber auch viele andersartige Beobachtungen liegen vor); für *Fritillaria* und einige ähnliche Objekte konnte an Hand von Färbungsunterschieden wahrscheinlich gemacht werden, daß die Paarung in der Richtung SFA → distal fortschreitet. Daß auch die Terminalisation der Chiasmen und die spätere Trennung der Chromatiden in dieser Richtung abzulaufen scheint, kann als Argument für die Entstehung der Chiasmen in der gleichen Richtung verwertet werden. — Mit *genetischen Methoden* hat MATHER (1936)<sup>2</sup> geglaubt, nachweisen zu können, daß sich bei *Drosophila melanogaster* die Chiasmen in der Richtung SFA → distal anlegen. Indes vermochte BOOST (1939), auf Grund einer direkteren Methodik sowie unter Erfassung aller erreichbaren Daten, zu zeigen, daß zwar — unter gewissen Voraussetzungen, die hier übergangen werden können — alle empirischen genetischen Daten mit einem Hintereinander-Entstehen der Chiasmen in der Richtung SFA → distal bis auf

<sup>1</sup> Mit Unterstützung aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

<sup>2</sup> In seiner zweiten Arbeit (1937) weist MATHER auf zytologischem Wege bei einigen anderen Organismen gewisse der 1936 bei *Drosophila* gefundenen Gesetzmäßigkeiten nach (ungefähr konstanter Interferenzabstand usw.), die mit der Frage nach einem Hintereinander-Entstehen der Chiasmen in keiner direkten Beziehung stehen. In der Meinung, das Hintereinander-Anlegen bei *Drosophila* schon bewiesen zu haben, glaubt MATHER auf Grund dieser Übereinstimmung, die These des Hintereinander-Anlegens auch auf diese Arten ausdehnen zu dürfen.

Einzelheiten im Einklang stehen, daß sie aber auch mit einer Chiasma-entstehung in der umgekehrten Richtung oder mit einer rein zufalls-mäßigen (ungerichteten) vereinbar sind. Eine hierher gehörige Unter-suchung von CHARLES (1938) ist bei BOOST berücksichtigt.

Eine andere Möglichkeit, auf Grund rein genetischer Daten an diese Frage heranzugehen, hat LUDWIG (1938) aufgezeigt. Legen sich die Chiasmen in jeder Tetrade räumlich hintereinander an, z. B. von links nach rechts:

1 2 3

(wobei die Ziffern die zeitliche, ihre Anordnung die räumliche Reihen-folge bedeuten), so ist anzunehmen, daß das 1. Chiasma auf das 2. eine Interferenzwirkung ausübt, ebenso das 2. auf das 3., aber es ist unwahr-scheinlich, daß Chiasma 1 über 2 *hinweg* noch auf 3 einen Einfluß hat. Somit ergäbe sich als zu erwartende Häufigkeit der 3fachen Chiasmen der Betrag  $2f_1 \cdot 2f_2 \cdot 2f_3 \cdot C_{12} \cdot C_{23}$ , worin  $f_i$  den Austauschwert des  $i$ -ten Intervalls und  $C_{ij}$  den Koinzidenzwert zwischen den Intervallen  $i$  und  $j$  bedeuten. Da die C-Werte für Chiasmen und Crossing-over (Brüche) die gleichen sind und ferner jedes Chiasma nur in der Hälfte der Fälle zu einem Crossing-over führt, lautet die entsprechende Formel, wenn  $[+++]$  die Häufigkeit der 3fachen Brüche bedeutet:

$$[+++]_{\text{theor I}} = f_1 \cdot f_2 \cdot f_3 \cdot C_{12} \cdot C_{23}. \quad (\text{I})$$

Legen sich die Chiasmen einer Tetrade aber mehr oder weniger *gleich-zeitig* an, dann ist anzunehmen — man denke etwa an die Spannungen in einem „Umwindungsmodell“ —, daß jedes in Entstehung begriffene Chiasma auf jede Stelle des Chromosoms, also auf jedes irgendwo gleich-zeitig sich bildende Chiasma, eine Interferenzwirkung ausübt. Als Häufigkeit der 3fachen Brüche ergäbe sich dann

$$[+++]_{\text{theor II}} = f_1 \cdot f_2 \cdot f_3 \cdot C_{12} \cdot C_{23} \cdot C_{13}. \quad (\text{II})$$

Entstehen die Chiasmen schließlich zwar zeitlich nacheinander, räumlich aber zufallsmäßig, d. h. ohne Einhaltung einer bestimmten Richtung, so sind die folgenden 6 Fälle möglich, wobei wiederum die Ziffern die zeitliche, ihre Anordnung die räumliche Aufeinanderfolge bedeuten:

$$\text{SFA} \rightarrow \text{distal (oder umgekehrt):} \quad \begin{array}{cccccc} 123 & 132 & 312 & 213 & 231 & 321 \\ a & b & c & d & e & f \end{array}$$

a entspricht einem Hintereinander-Anlegen von links nach rechts, bei b, fällt das 3. Chiasma rückwärts zwischen das 1. und 2. usf. Für a, c, d und f wäre einseitige, für b und f 3fache Interferenzwirkung an-zunehmen, da z. B. im Falle b zunächst das 1. Chiasma auf das 2. eine Interferenzwirkung ausübte und hinterher sowohl Chiasma 1 wie 2 auf das zwischen beide fallende 3. Chiasma. In diesem 3. Falle müßte die Häufigkeit der 3fachen Brüche also zwischen  $[+++]_{\text{theor I}}$  und  $[+++]_{\text{theor II}}$  und zwar näher an ersterem Werte liegen.

In der Praxis sind nun innerhalb eines Chromosomenschenkels 3fache Crossing-over recht selten, ihre Häufigkeit übersteigt höchstens für sehr lange Regionen den Wert 1%. Mehrfache Brüche treten noch viel weniger auf. Bevor deshalb die 3- und mehrfachen Crossing-over als Indizium für die Art der Chiasmabildung herangezogen werden, ist zu prüfen, ob ihre beobachteten Häufigkeiten überhaupt zuverlässige Größen sind, d. h. ob nicht etliche der mehrfachen Brüche durch subjektive Klassifikationsfehler, Nichtmanifestation einzelner Gene oder gelegentliche Mutationen vorgetäuscht sind.

Tabelle 1 gibt die Antwort. In ihr sind für alle erreichbaren größeren Mehrpunktversuche an 4 *Drosophila*-Arten die Häufigkeiten der empirischen 3- und mehrfachen Brüche den nach Formel (I) errechneten gegenübergestellt.

Daß für die Berechnung Formel (I) und nicht Formel (II) benutzt wurde, rechtfertigt sich einerseits durch die späteren Ergebnisse, spielt im übrigen aber keine Rolle. Denn der Faktor  $C_{12}$ , um den sich  $[+++]_{\text{theor I}}$  und  $[+++]_{\text{theor II}}$  unterscheiden, liegt für die meisten Intervalle außerordentlich dicht bei 1, so daß beide Formeln praktisch identisch werden. Unter 1086 3fachen Brüchen an den X-Chromosomen von *Drosophila* ist z. B. nur für 60 der  $C_{12}$ -Wert  $< 1$ . Da ferner etliche  $C_{12}$ -Werte über 1 liegen, liefern die Formeln (I) und (II) für diese Gesamthäufigkeiten der mehrfachen Brüche nahezu die gleichen Zahlen. — Der Berechnung der Werte  $(3)_{\text{theor}}$  usw. in Tabelle 1 müssen die Summen aller  $\binom{n}{3}$  Kombinationen der Intervalle zugrunde gelegt werden. Für die 4fachen Brüche gilt in Modifikation von (I)

$$[++++]_{\text{theor I}} = f_1 \cdot f_2 \cdot f_3 \cdot f_4 \cdot C_{12} \cdot C_{24} \cdot C_{34}$$

und Entsprechendes für  $[+++++]$  usw. — Zu beachten ist ferner, daß jeder empirisch 4fache Bruch  $\binom{4}{3} = 4$ mal als theoretisch 3facher zählt, jeder empirisch 5fache  $\binom{5}{4} = 5$ mal als theoretisch 4facher und  $\binom{5}{3} = 10$ mal als theoretisch 3facher usw.; ein empirisch 6facher Bruch zählt also  $\binom{6}{3} = 20$ mal als theoretisch 3facher, was später gelegentlich zu beachten sein wird. — Zur Berechnung der theoretischen Werte in Tabelle 1 wurden ferner nicht die  $f$ - und  $C$ -Werte (Formel I), sondern die diesen zugrunde liegenden Originalzahlen benutzt; Rechnung mit Multiplikationsmaschine. Bei anderer Berechnungsweise können kleine Abweichungen in der letzten Stelle auftreten (vgl. Versuch A 6 hier und Versuch KIKKAWA in LUDWIG 1938, Tabelle 8).

Die Versuche A 1 bis A 15 der Tabelle 1, die sich auf die X-Chromosomen von 4 *Drosophila*-Arten beziehen, zeigen eine geradezu frappierende Übereinstimmung zwischen berechneten und beobachteten Werten, von Versuch A 1 abgesehen:

3fache Brüche: 1109 theor. gegen 1090 bzw. 1117 empir.

4 „ „ : 56 „ „ 63 empir.

5 „ „ : 2 „ „ 2 „

Der Wert 1117 der 1. Zeile bezieht sich darauf, daß von den 15 A-Versuchen der Tabelle 1 (wie bereits erwähnt) nur der schwer klassifizierbare 9-Gen-Versuch

Tabelle 1.

Nr.	Autor, Jahr	Art. Chrom.	Intervall	Gene	T	J	(3)		(4)		(5)		Bemerkungen
							emp.	theor.	emp.	theor.	emp.	theor.	
A 1	MORGAN, BRIDGES, SCHULTZ 1935	mel. X	sc-bb	9	16136	?	61	88,0	0	1,2	—	—	19°
A 2	BRIDGES, OLBRYCHT 1926	mel. X	sc-f	7	20786	1,05	37	36,3	2	0,3	—	—	25°, ♀
A 3	RECK 1936	mel. X	y-bb	7	13595	1,11	137	136,9	1	2,2	—	—	22°
A 4	L. V. MORGAN 1933	mel. X	ec-bb	7	2623	1,05	10	11,3	1	0,2	—	—	
A 5	STONE, THOMAS 1935	mel. X	y-car	4	1614	1,17	4	3,3	0	0,0	—	—	
A 6	KIKAWA 1935	vir. X	ec-rg	6	2802	?	309	296,4	54	49,2	2	2,3	
A 7	KIKAWA 1932	vir. X	ec-w	6	4188	1,32	72	72,2	0	2,4	—	—	
A 8	STURTEVANT 1929	sim. X	y-bb	5	442	?	4	1,6	0	0,0	—	—	
A 9	STURTEVANT 1929	sim. X	y-bb	5	320	1,27	0	2,3	0	0,0	—	—	
A 10	STURTEVANT 1929	sim. X	y-f	5	1975	1,16	2	2,2	—	—	—	—	
A 11	STURTEVANT 1929	sim. X	y-f	5	366	1,23	1	0,4	—	—	—	—	
A 12	STURTEVANT 1929	sim. X	y-f	5	396	1,53	1	0,5	—	—	—	—	
A 13	GOTTSCHEWSKI 1939	pseudo-obsc. X	bd-sp	4	8558	1,12	398	401,1	—	—	—	—	1
A 14	LUDWIG, SCHMIDT 1937	In/In mel. X	y-ov	6	5266	1,04	23	22,1	4	0,7	—	—	1
A 15	GRÜNEBERG 1935	In/In mel. X	y-ov	5	3539	1,19	31	35,5	1	0,4	—	—	
Summe							1090	1109	63	56,6	2	2,3	
B 1	GRAUBARD 1932	mel. II	al-sp	8	5284	1,19	85	87,4	5	3,6	—	—	25°
B 2	BEADLE 1932	mel. III	ru-aa	8	1019	1,37	65	71,8	2	5,5	—	—	
C 1	RECK 1936	mel. X	y-bb	7	10966	1,07	207	193,5	1	6,9	—	—	♀, 30°
C 2	GRAUBARD 1932	mel. II	al-sp	8	4514	1,23	201	205,3	17	16,3	1	0,75	30°, *

Versuch A: Gegenüberstellung der empirischen und theoretischen (= nach Formel I berechneten) 3-, 4- und 5fachen Brüche in allen erreichbaren größeren Mehrpunktversuchen an den X-Chromosomen von *D. melanogaster*, *virilis*, *simulans*, *pseudoboscus*. T Individuenzahl des Versuchs, J Asymmetrieindex (LUDWIG 1936, 1938). Bem. Bemerkungen: Zuchttemperatur (von der Norm abweichend oder zur Kennzeichnung des Versuchs nötig). Versuche B: Desgleichen für das II. und III. Chromosom. Versuche C: Crossing-over-Versuche nach Vorbehandlung der Mütter bei 30°.

\* Homozygote Inversion „x“ (GRÜNEBERG), fast die ganze Länge des X einnehmend. Im übrigen vgl. den Text! \* GRAUBARD führt 1 6fachen, 2 8fachen, 17 4fachen und 201 3fachen Brüche an. Da der 6fache Bruch nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,01 zu erwarten ist, seine Einbeziehung ferner zu unmöglichen (negativen) Werten führt — dann er ist z. B. 20 3fachen Brüchen homolog (s. Text) —, wurde er sowie auch einer der beiden 6fachen Brüche als vorgetauscht erachtet. Dann ergibt sich volle Übereinstimmung (s. Tabelle).

A 1, der aus diesem Grunde bei 19° statt 25° angesetzt wurde, aus der Reihe fällt. Sein Asymmetrieindex ist unbekannt. Die empirische Zahl 61 der 3fachen Brüche ist hier zweifellos infolge Fehlmanifestationen oder ähnlichem zu klein. Addiert man das vermutliche Defizit von  $88 - 61 = 27$  3fachen Brüche zur Gesamtsumme, so resultiert 1117 empirisch gegen 1109 theoretisch, also eine Übereinstimmung von gleicher Größenordnung als wenn man Versuch A 1 wegließe (1029 gegen 1021).

Auch die beiden Versuche mit homozygoten Inversionen (A 14 und A 15) weisen keine wesentlichen Diskrepanzen auf, und selbst die zwei 5fachen Brüche KIKKAWAS entsprechen der Erwartung. Für das 2. und 3. Chromosom von *D. melanogaster* sind infolge ungünstigerer Versuchsbedingungen<sup>1</sup> von vornherein größere Unterschiede zwischen berechneten und beobachteten Werten zu erwarten. Immerhin zeigen die beiden zufällig herausgegriffenen Versuche B 1 und B 2 nur geringe Differenzen; bei B 2 sind übrigens die geringe Individuenzahl und der hohe Asymmetrieindex in Rechnung zu ziehen.

Schließlich kann auf diese Weise auch geprüft werden, ob die zum Teil umstrittene Erhöhung der Häufigkeiten mehrfacher Brüche als Folge einer *Hitzebehandlung* der P-♀ einen reellen Tatbestand darstellt oder ob, wie man vermuten könnte, dieser Effekt größtenteils durch sekundäre Faktoren (Hitze-Phänokopien, Fehlmanifestationen usw.) zustande kommt. Die Beispiele C 1 und C 2 der Tabelle 1, die einzigen für hohe Temperaturen vorliegenden Mehrpunktversuche, zeigen eine durchaus befriedigende Übereinstimmung zwischen Theorie und Beobachtung<sup>2</sup>, sie erweisen somit, daß durch hohe Temperaturen die Zahl der mehrfachen Brüche, namentlich in der SF-Region, tatsächlich gesteigert wird. Daß GRAUBARD (1934) solches leugnet, ist unwesentlich, da er ein unrichtiges Koinidenzmaß verwendete (vgl. LUDWIG 1938, S. 86f.).

Die bisherigen Feststellungen zeigen also, daß die Häufigkeiten der mehrfachen Brüche für etwaige Untersuchungen über die Art der Chiasmaentstehung eine einwandfreie Unterlage bilden. Für einen Entscheid aber, ob die Chiasmabildung gemäß Formel (I) oder Formel (II) vor sich geht, sind *nur solche 3fache Brüche* verwendbar, für die der *Koinidenzwert zwischen 1. und 3. Intervall deutlich < 1* ist, und Entsprechendes gilt für die mehrfachen Brüche. In Tabelle 2 sind nur  $C_{13}$ -Werte < 0,90 berücksichtigt.

Leider ist die Zahl der Brüche, die dieser Bedingung genügen, sehr gering. Von den 1090 3fachen Brüchen der Tabelle 1A, die auf 82605 Fliegen basiert, sind nur es 60, und noch geringer ist ihre Zahl bei den 2schenkligen Chromosomen. Hier dürfen nur 3fache Brüche betrachtet

<sup>1</sup> Denn sie gestatten z. B. nicht wie das X-Chromosom ♂-Auszählung bei alternierender Genanordnung.

<sup>2</sup> Daß bei der Berechnung der C-Werte die wenigen empirischen mehrfachen Brüche mitverwendet werden müssen, spielt bei diesen Übereinstimmungen keinerlei merkbare Rolle.



werden, die ganz auf *einem* Schenkel liegen<sup>1</sup>. Von den 201 3fachen Brüchen des GRAUBARDSchen Versuches C 2 tun dies links 4, rechts 2, alle übrigen umgreifen die SFA<sup>2</sup>. In Tabelle 2 sind zunächst die Versuche am X-Chromosom vom *D. melanogaster* (A 1 bis A 5) zusammengestellt. Es ergibt sich:

3fache Brüche empirisch . . . . .	24
3 „ „ theor. bei einseitiger Interferenz . . . . .	25,15
3 „ „ „ „ dreifacher „ . . . . .	16,6

was deutlich zugunsten von Formel (I), also für „einseitige“ Interferenz spricht. Dieses Ergebnis wird dadurch bestärkt, daß sich alle 5 Versuche gleichartig verhalten. Auch innerhalb der *Fiduzial*-Fehlerbreiten bleibt das Resultat bestehen (BOOST 1939). Von den Versuchen A 6 bis A 13 (andere *D.*-Arten) enthalten nur A 7 und A 10 3fache Brüche mit  $C_{12} < 1$  bzw. lassen solche in beobachtbarer Häufigkeit (= mindestens einen) erwarten. Wiederum stimmt die empirische Häufigkeit mit der nach Formel I errechneten überein. Insgesamt ergeben also die Versuche A 1 bis A 13:

A 1 bis A 5 . . . empir.	24	theor. I . . .	25,1	theor. II . . .	16,6
A 7 und A 10 . . . „	23	„ I . . .	23,7	„ II . . .	19,6
Defizit von A 1 <sup>3</sup> . . .	3,9				
Summe: . . . empir.	50,9	theor. I . . .	48,85	theor. II . . .	36,2

Die beiden Inversionsversuche schließlich enthalten zwar (Tabelle 1) die erwartete Zahl 3facher, aber etwas zuviel 4fache Brüche. Von den 4 4fachen Brüchen in A 14 dürften 3, die derselben Bruchklasse angehören, vorgetauscht sein. In Tabelle 2 sind daher in den betreffenden Spalten nur die 3fachen, nicht die 4fachen (deren jeder mehrmals als 3facher zählt) berücksichtigt; aus dem gleichen Grunde wurden diese beiden Versuche in die Gesamtsumme nicht mit einbezogen.

Bei den *zweischenkligen Chromosomen* dürfen, wie bereits erwähnt, nur mehrfache Brüche verglichen werden, die ganz auf *einem* Schenkel liegen. In Tabelle 2 PQR ist bei Versuchen, die sich über beide Schenkel erstrecken, die jeweils nicht betrachtete Region eingeklammert; Versuche, die ein ganzes Chromosom umfassen, erscheinen in ihr zweimal. Die Gesamtheit der Versuche ist unterteilt in die Gruppen P (Chromosom II, Versuche anderer Autoren), Q (Chromosom III), R (Chromosom II, Versuche der Verfasser). Diese letzteren Versuche waren vor allem deshalb ausgeführt worden, weil am 2. Chromosom für ganze

<sup>1</sup> Denn C-Werte zwischen 2 Loci verschiedener Schenkel sind niemals  $< 1$ . Von den beiden „Schenkeln“ al-pr und pr-sp muß übrigens auch einer die SFA umgreifen, da das Gen pr nicht genau an dieser Stelle liegt. Von den empirischen Brüchen kann aus diesem Grunde möglicherweise noch einer abgezogen werden.

<sup>2</sup> Versuch A 1 in Tabelle 1 ergab ein Defizit von 27 empirischen Brüchen. Erhöht man die Zahl 9 in A 1 (Tabelle 2) im gleichen Verhältnis 88 : 61, so müssen 3,9 Brüche addiert werden.

Tabelle 2.

Nr.	Autor, Jahr	Chromo- som	Gene <sup>1</sup>	T	J	3fache Brühe			Bemerkungen
						emp.	theor. n. 1	theor. n. II	
A 1	siehe Tabelle 1	X	siehe Tabelle 1			9	13,30	9,57	
A 2	siehe Tabelle 1	X	siehe Tabelle 1			9	7,27	4,19	
A 3	siehe Tabelle 1	X	siehe Tabelle 1			3	2,37	1,57	
A 4	siehe Tabelle 1	X	siehe Tabelle 1			2	1,27	0,47	
A 5	siehe Tabelle 1	X	siehe Tabelle 1			1	0,94	0,80	
	Summe			54754		24	25,15	16,6	
A 7	siehe Tabelle 1	vir. X	siehe Tabelle 1			21	21,5	18,01	
A 10	siehe Tabelle 1	sim. X	siehe Tabelle 1			2	2,2	1,63	
	Summe			6163		23	23,7	19,6	
A 14	siehe Tabelle 1	mel. X In.	siehe Tabelle 1			10	12,3 <sup>1</sup>	9,37	1 — 8
A 15	siehe Tabelle 1	mel. X In.	siehe Tabelle 1			3	3,7 <sup>2</sup>	2,37	2 — 1
	Summe			8805		13	16,0 <sup>2</sup>	11,7 <sup>2</sup>	3 — 9
P 1	GRAUBARD 1932	II L	al dp b pr (cn vg L <sup>c</sup> sp)	5284	1,19	2	0,45	0,32	
P 2	REDFIELD 1932	II L	al dp b pr (c px sp)	3819	1,53	4	1,23	1,02	
P 3	REDFIELD 1932	II L	al dp b pr	9190	?	0	0,66	0,51	
P 4	REDFIELD 1932	II R	(al dp b) pr c px sp	3819	1,53	3	0,86	0,51	
P 5	REDFIELD 1932	II R	pr c px sp	9603	?	3	0,67	0,48	
P 6	GRAUBARD 1932	II R	(al dp b) pr cn vg L <sup>c</sup> sp	5284	1,19	2	2,52	1,44	
	Summe			27896		14	6,39	4,28	
Q 1	BRIDGES 1929	III L	ru h D st (p <sup>v</sup> se e <sup>+</sup> )	15544	?	0	0,22	0,12	} der gleiche Ver- such
Q 2	BRIDGES 1929	III L	ru h D st p <sup>v</sup> (se e <sup>+</sup> )	15544	?	2	1,34	1,29	
Q 3	BRIDGES, MORGAN 1923	III R	(D) p <sup>v</sup> se e <sup>+</sup> ro	626	1,13	0	0,12	0,08	
Q 4	REDFIELD 1930	III R	(ru h th st) cu sr e <sup>+</sup> ca)	5009	1,48	1	0,86	0,61	
	Summe (ohne Q 1)			21179		3	2,32	1,98	

	Ludwig, Boost 1938	II L	al <sup>a</sup> J <sup>b</sup>	3885	1,33	41	17,40	16,88	4 L. (1936)
R 1	Ludwig, Boost 1938	II L	al <sup>a</sup> J <sup>b</sup>	10554	1,15	29	10,94	7,06	4 } der gleiche Ver-
R 2	Ludwig, Boost 1938	II L	al <sup>a</sup> Sp J <sup>b</sup>	6518	1,18	15	5,52	2,72	4 } auch B. (1937)
R 3	Ludwig, Boost 1938	II L	al <sup>a</sup> Sp J <sup>b</sup>	4378	1,15	1	2,44	1,49	4 L. (1936)
R 4	Ludwig, Boost 1938	II R	b Bl L <sup>a</sup> fj px sp	2822	1,10	3	0,96	0,51	4 B. (1937)
R 5	Ludwig, Boost 1938	II R	b Bl L <sup>a</sup> fj px sp						
	Summe (ohne R 5)			21 639		74	31,74	25,94	
	Gesamtsumme über das II. + III. Chrom.			70 714		91	40,45	32,30	

Vergleich der empirischen Häufigkeiten der 3fachen Brüche mit den nach Formel I und Formel II errechneten Häufigkeiten. In Spalte „Chromosom“ ist, falls nichts anderes bemerkt, die Art stets *Drosophila melanogaster*. Im übrigen vgl. den Text — 1., 2. S. Text. — \* Ablegealter 1.—16. Tag. — \* Ablegealter 1.—8. Tag. Bei Gruppe R zeigt in Spalte „Bemerkungen“ die Zahl das Versuchsjahr, der Buchstabe den Autor an.

Schenkel und bei guter und hinreichender Intervallunterteilung nichts Ähnliches vorlag. Im Gesamtergebnis ist zunächst am auffälligsten, daß empirisch weit mehr 3fache Brüche auftreten als selbst nach Formel I zu erwarten wäre. Der Überschuß beträgt sowohl in Gruppe P (fremde Autoren) wie in R (Verf.) mehr als 100%, während Gruppe Q (III. Chromosom) infolge der sehr kleinen Absolutzahlen keinen Vergleich zuläßt. Nun geben innerhalb des Gesamtmaterials (91 3fache Brüche auf 70714) die beiden Versuche R 1 und R 2 der Verf. (70 Brüche auf 14439) den Ausschlag. Daß bei diesen subjektive Klassifikationsfehler kaum in Frage kommen, erweisen folgende Indizien: 1. Die Diskrepanzen zwischen Theorie und Beobachtung sind in Gruppe P (fremde Autoren) und R (Verf.) gleich groß; 2. die Merkmale der Versuche R 1—2 sind gut klassifizierbar; 3. beide Versuche, von verschiedenen Personen und in verschiedenen Jahren vorgenommen und zum Teil aus Einzelversuchen zusammengesetzt, zeigen stets den gleichen Überschuß (vgl. R 3, der in R 2 enthalten ist); 4. andere Versuche der Verf. (z. B. A 14 und R 4, R 5) zeigen keinen solchen Überschuß. — Die Einzelergebnisse der Versuche, veröffentlicht in DIS 10, lassen auch keinerlei systematische Asymmetrie erkennen, durch die gerade eine Erhöhung der 3fachen Brüche vorgetäuscht werden könnte. Ferner führen jene Besonderheiten in der Umgebung der SFA, die am einfachsten als partielle Asynapsis beschrieben werden können (vgl. Ludwig 1939, ferner Boost 1939), zu keiner Erklärung; denn auch beliebige Asynapsis in der SF-Region führt zu keiner vorgetäuschten Erhöhung der mehrfachen Brüche innerhalb eines Schenkels. Somit verbleibt lediglich die Annahme, daß derzeit unbekannte Faktoren

für diese Diskrepanz verantwortlich sind, wobei die Möglichkeit, daß es sich doch noch um zufällige Fehler handelt, nicht ausgeschlossen werden soll. Da die Verhältnisse der Häufigkeiten der nach Formel II und I zu erwartenden 3fachen Brüche, die ja auf empirischen Daten beruhen, hier ungefähr die gleichen sind wie bei den X-Chromosomen, erscheint die Annahme plausibel, daß die zu hohe empirische Bruchzahl durch einen sich sekundär überlagernden Faktor zustande kommt. Dann aber sprechen die Ergebnisse der Tabelle 2, soweit sie das 2. und 3. Chromosom betreffen, keinesfalls gegen eine einseitige Interferenzwirkung, sondern eher für sie.

Daß für die X-Chromosomen verschiedener *Drosophila*-Arten die empirischen Häufigkeiten der 3fachen Brüche mit den bei einseitiger Interferenzwirkung zu erwartenden sehr gut übereinstimmen, steht mit der Annahme einer gleichzeitigen Entstehung aller Chiasmen einer Tetrade nicht im Einklang. Die Chiasmen legen sich also zeitlich nacheinander an, entweder in bestimmter Richtung oder rein zufallsmäßig. Im letzteren Falle müßte die empirische Häufigkeit der 3fachen Brüche zwischen den nach Formel I und Formel II errechneten Werten liegen, etwas näher an ersterem. Da in Wirklichkeit Beobachtung und Berechnung nach I außerordentlich gut übereinstimmen, darf (in Anbetracht der kleinen verfügbaren Absolutzahlen) mit größerer Wahrscheinlichkeit auf ein räumlich-zeitliches Hintereinander-Anlegen geschlossen werden. Hierbei verdient aus anderen, in der Einleitung genannten Gründen, die Richtung SFA  $\rightarrow$  freies Ende den Vorzug. Die Ergebnisse an den zweischenkligen Chromosomen sind für diese Beweisführung zwar nur unter Einschränkung verwertbar, sprechen aber keinesfalls gegen, sondern eher für die gezogene Folgerung.

#### Anhang.

*Statistische Prüfung mit  $\chi^2$ .* 1. Tabelle 1, Versuche A1—15, 3fache Brüche. Die 15 Versuche sind in 3 Gruppen aufzuteilen: In den einzigen abweichenden Versuch A1, in die Versuche A2—4, 6, 7, 13—15 mit vielen Brüchen pro Versuch (10—398) und in die Versuche A5, 8—12 mit sehr wenig Brüchen pro Versuch (0—4). A1 liefert für Übereinstimmung zwischen Theorie und Beobachtung die Wahrscheinlichkeit  $P < 0,01$ , erweist sich also als unstimmig (s. o.); die zweite Versuchsgruppe liefert ein  $P > 0,99$  (sehr gute Übereinstimmung), die dritte nach der gewöhnlichen  $\chi^2$ -Methode ein  $P \approx 0,30$ , das sich infolge der Kleinheit der Proben noch erhöht (also auch gute Übereinstimmung). — 2. Tabelle 2, Versuche A2—5, 7, 10. Für die Übereinstimmung mit Hypothese I ergibt sich ein  $P > 0,98$ , für Übereinstimmung mit Hypothese II ein  $P < 0,05$ . Nennen wir ersteres  $P_1$ , letzteres  $P_2$ , so wird der Quotient  $P_1/(1-P_1) : P_2/(1-P_2) \approx 1000$ , die Chancen zugunsten von Hypothese I sind also etwa 1000mal größer als zugunsten von II. — Ferner ergibt sich bei zeitlichem Hintereinanderanlegen, aber ungerichteter Chiasmabildung, wobei also in  $\frac{1}{3}$  der Fälle 3fache Interferenz vorläge, ein  $P = 0,85$ , das  $P_2$  genannt sei. Man erhält  $P_1/(1-P_1) : P_2/(1-P_2) = 8,6$ . Somit erweist sich gerichtete Chiasmabildung als wahrscheinlicher als ungerichtete.

## Zusammenfassung.

1. 3—5fache Crossing-over bzw. Chiasmen treten in den X-Chromosomen verschiedener *Drosophila*-Arten in Häufigkeiten auf, die der theoretischen Erwartung außerordentlich genau entsprechen. Für die V-förmigen Chromosomen von *D. melanogaster* ist die Übereinstimmung erwartungsgemäß etwas geringer, aber sehr gut. Klassifikationsfehler, Fehlmanifestationen von Genen, Mutationen usw. sind also von vernachlässigbarem Einfluß.

2. Die Erhöhung der Häufigkeiten der 3- und mehrfachen Chiasmen infolge Vorbehandlung der ♀ mit hohen Temperaturen entspricht gleichfalls der Erwartung, ist also nicht vorgetäuscht.

3. Für die X-Chromosomen verschiedener *D.*-Arten stehen die Häufigkeiten aller verwertbaren mehrfachen Chiasmen ( $C_{13} < 1$ ) mit „einseitiger“ Interferenzwirkung im Einklang. Dies spricht gegen ein gleichzeitiges Entstehen aller Chiasmen einer Tetrade und mit größerer Wahrscheinlichkeit für als gegen ein zeitliches Hintereinander-Anlegen der Chiasmen in bestimmter Richtung. (Hierbei verdient aus anderen Gründen die Richtung SFA → freies Ende den Vorzug.)

4. Die Häufigkeiten der entsprechenden mehrfachen Chiasmen in den zweischenkligen Chromosomen sind sehr gering und durch sekundäre Faktoren beeinträchtigt. Sie sprechen, falls man sie zu einem Entscheid der sub 3 aufgeworfenen Frage heranzieht, mehr für als gegen das dort erhaltene Ergebnis.

## Schrifttum.

- Boost, Ch.: Genetische Untersuchungen zur Chiasmabildung und Interferenzwirkung bei *Drosophila*. Z. Abstammungslehre 77, 386—449 (1939) (im Druck). — Charles, D. R.: The spatial distribution of cross-overs in X-chromosome tetrads of *Drosophila melanogaster*. J. Genet. 36, 103—126 (1938). — Gottschewski, G.: Über den Einfluß des Mutteralters auf den Faktorenaustausch im X-Chromosom von *Drosophila pseudoobscura*. Chromosoma 1, 238—252 (1939). — Graubard, M. A.: Temperature effect on interference and crossing-over. Genetics 19, 83—94 (1934). — Kikkawa, H.: Theoretical research on the mechanism of crossing-over in *Drosophila*. Jap. J. Genetics 9, 15—50 (1933/34). — Ludwig, W.: Asymmetrie-Index bei Crossover-Versuchen. DIS 5, 25, 26 (1936). — Faktorenkoppelung und Faktorenaustausch bei normalem und aberrantem Chromosomenbestand. Leipzig 1938. — Beziehungen zwischen Chiasmabildung, Interferenz und Asynapsis bei *Drosophila melanogaster*. Z. Naturwiss. 93, 54—62 (1939). — Ludwig, W. u. Ch. Boost: Report. Linkage values of the II chromosome of *D. melanogaster*. DIS 10, 56—57 (1938). — Mather, K.: The determination of position in crossing-over. I. J. Genet. 33, 207—235 (1936). — II. Cytologia (Jap.), Fujii-Festschr. 1937, 514—526.

Bezüglich der in Tabelle 1 und 2 aufgeführten Autoren, soweit sie hier nicht angegeben sind, vgl. LUDWIG (1938).

(Genetische Abteilung des Kaiser-Wilhelm-Instituts, Berlin-Buch.)

## ZUR FRAGE DER BEZIEHUNGEN ZWISCHEN STRAHLEN- AUSGELÖSTEN PUNKT- UND CHROMOSOMENMUTATIONEN BEI DROSOPHILA<sup>1</sup>.

Von

N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 10. Oktober 1939.)

### 1. Einleitung

Das Problem der Beziehungen zwischen Punkt- und Chromosomenmutationen (Chromosomenstückumgruppierungen, die mehrere, bzw. viele Loci umfassen) umfaßt drei Hauptfragen. Die erste ist rein praktischer Natur und betrifft die Dosisproportionalitätskurven strahlen-induzierter geschlechtsgebundener Letalfaktoren bei *Drosophila*; falls nämlich, wie es jetzt feststeht, die Letalfaktoren ein Gemisch von Punkt- und Chromosomenmutationen darstellen, und falls die Chromosomenmutationen sich anders als die Punktmutationen mit Steigerung der Bestrahlungsdosen verhalten, so könnte das sich in der Form der Dosisproportionalitätskurve der so oft in strahlengenetischen Versuchen als Testreaktion benutzten geschlechtsgebundenen Letalfaktoren äußern. Die zweite Frage bezieht sich auf die relativen Anteile von Punkt- und Chromosomenmutationen im spontanen Mutationsprozeß und nach Behandlung mit verschiedenen Agentien. Schließlich betrifft die dritte Frage die Natur und den Mechanismus der Punktmutationen einerseits und der Chromosomenmutationen andererseits; speziell handelt es sich dabei um die Primäreffekte, die zu der Auslösung der beiden Mutationsformen führen.

In dieser Arbeit wird Material zu der ersten der oben aufgestellten Fragen gebracht; die zwei anderen werden in der Diskussion nur kurz gestreift.

### 2. Versuchsergebnisse.

Es ist mit großer Sicherheit in Versuchen verschiedener Autoren gezeigt worden (DEMEREZ 1933, EFROMSON 1931, OLIVER 1932, TIMOFÉEFF-RESSOVSKY 1931, 1934, 1937), daß die Gesamtrate geschlechtsgebundener Mutationen von *Drosophila* den Röntgenbestrahlungsdosen direkt proportional ist. Die Gesamtmutationsrate setzt sich aber aus verschiedenen Mutationsformen zusammen; quantitativ dominierend sind dabei die rezessiven Letalfaktoren, so daß sie für die Form der gewonnenen Dosisproportionalitätskurve als ausschlaggebend angesehen werden müssen. In einigen Bestrahlungsversuchen wurde auch die

<sup>1</sup> Ein Teil der dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.



Dosisproportionalität einzelner bestimmter nichtletaler Mutationen oder Mutationsgruppen untersucht (HEPTNER und DEMIDOVA 1936, TIMOFÉEFF-RESSOVSKY und DELBRÜCK 1936), und für diese Mutationen ebenfalls eine direkte Proportionalität zur Röntgendosis gefunden. Schließlich liegt über die Art der Dosisproportionalität von Chromosomenmutationen noch kein endgültig gesichertes Material vor (BAUER 1937, 1938; DOBZHANSKY 1936; STUBBE 1937; TIMOFÉEFF-RESSOVSKY 1937). Eine Reihe bisheriger Versuche zeigen aber, daß bei verschiedenen Objekten die verschiedenen Formen von Chromosomenaberrationen (die auf mindestens zwei Chromosomenbrüchen beruhen) im allgemeinen nicht linear mit der Dosis ansteigen (BAUER 1939; BAUER, DEMEREC und KAUFMANN 1938; BELGOVSKY 1937; CATCHESIDE 1938; KHVOSTOVA und GAVRILOVA 1938; MÜLLER 1938; SAX 1938, 1939).

In den folgenden Tabellen ist ein ziemlich umfangreiches Material über die Dosisproportionalität verschiedener Formen von geschlechtsgebundenen Mutationen bei *Drosophila melanogaster* aus Röntgenbestrahlungsversuchen, die sich über mehrere Jahre ausdehnten zusammengestellt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis unserer Versuche über Auslösung von geschlechtsgebundenen Letalfaktoren bei *Drosophila melanogaster* durch Bestrahlung der P-♂♂ mit 1500 r, 3000 und 6000 r mittelharter Röntgenstrahlen (100 bis 180 kV, 1 mm Al) angegeben. In diesen Versuchen wurden nur die rezessiven Letalfaktoren mit Hilfe der „CIB“-Kreuzungsmethode registriert; sie zeigen eine direkte Proportionalität zur Dosis.

In Tabelle 2 sind ähnliche Versuche (auch 1500 r, 3000 r und 6000 r mittelharter Röntgenstrahlen) mit nichtletalen, „sichtbaren“ geschlechtsgebundenen Mutationen zusammengefaßt. Sie ergeben ebenfalls eine gut gesicherte direkte Dosisproportionalität. Die Tabelle 3 bringt eine

Tabelle 1.

Zahlen der geschlechtsgebundenen Letalfaktoren bei *Drosophila melanogaster* nach Bestrahlung der P-Männchen mit drei gestaffelten Dosen mittelharter Röntgenstrahlen; die bestrahlten ♂♂ wurden mit „CIB“-♀♀ gekreuzt.

Röntgendosis	Zahl der geprüften X-Chromosomen	Zahl der Letalfaktoren	Prozentsatz der Letalfaktoren
Kontrolle	32140	63	0,19 ± 0,02
1500 r	15281	649	4,25 ± 0,16
3000 r	11738	1027	8,75 ± 0,26
6000 r	9116	1462	16,04 ± 0,38

Tabelle 2.

Zahlen der geschlechtsgebundenen „sichtbaren“ (nichtletalen) Mutationen bei *Drosophila melanogaster* nach Bestrahlung der Männchen mit drei gestaffelten Dosen mittelharter Röntgenstrahlen; die bestrahlten Männchen wurden teils mit „CIB“, teils mit „attached X“-Weibchen gekreuzt.

Röntgendosis	Zahl der geprüften X-Chromosomen	Zahl der „sichtbaren“ Mutationen	Prozentsatz der „sichtbaren“ Mutationen
Kontrolle	19869	4	0,02 ± 0,01
1500 r	18183	41	0,23 ± 0,04
3000 r	15271	69	0,45 ± 0,05
6000 r	10513	96	0,91 ± 0,09

Zusammenstellung über den Anteil von letalen und sichtbaren Mutationen unter allen geschlechtsgebundenen Mutationen, die in sämtlichen Röntgen-, Radium- und Neutronenbestrahlungsversuchen mit verschiedenen

Tabelle 3.

Vergleich des relativen Anteils von nichtletalen („sichtbare“) und letalen unter allen geschlechtsgebundenen Mutationen von *Drosophila melanogaster* in unbestrahlten Kulturen und nach schwacher (375–1500 r), mittlerer (1800–4500 r) und starker (4800–6000 r) Röntgenbestrahlung.

Herkunft der Mutationen	Zahl der geschlechtsgebundenen Mutationen			Prozentsatz der „Sichtbaren“
	„sichtbare“	Letalfaktoren	total	
Unbestrahlte Kontrolle . .	19	143	162	11,7 $\pm$ 2,5
Schwache Röntgendosen . .	61	686	747	8,2 $\pm$ 1,0
Mittlere Röntgendosen . .	111	1382	1493	7,4 $\pm$ 0,7
Starke Röntgendosen . . .	68	794	862	7,9 $\pm$ 0,9

Dosen (in denen beide Mutationstypen registriert werden konnten) ausgelöst wurden. Bei Anwendung niedriger, mittlerer und hoher Dosen bleibt der relative Anteil der „sichtbaren“ Mutationen praktisch konstant (etwa 8% aller geschlechtsgebundenen Mutationen). Daraus ist ebenfalls zu schließen, daß diese beiden Mutationstypen im wesentlichen gleiche Dosisproportionalität aufweisen. Dagegen scheint im spontanen Mutationsprozeß der relative Anteil der Letalfaktoren etwas geringer zu sein, obwohl der Unterschied ( $4,0 \pm 2,6\%$ ) statistisch noch nicht gesichert ist.

In Tabelle 4 sind alle Chromosomenmutationen des X-Chromosoms, die mit Hilfe genetischer Methoden in Kreuzungen bestrahlter ♂ mit ♀,

Tabelle 4.

Zahlen der genetisch (kreuzungsanalytisch) feststellbaren Inversionen, Deletionen und Translokationen des X-Chromosoms von *Drosophila melanogaster* nach Bestrahlung der Männchen mit drei gestaffelten Dosen mittelharter Röntgenstrahlen.

Röntgen-dosis	Zahl der geprüften X-Chromosomen	Zahl der Inversionen, Deletionen und Translokationen	Prozentsatz der Inversionen, Deletionen und Translokationen
Kontrolle	1447	0	—
1500 r	1371	8	0,58 $\pm$ 0,17
3000 r	982	21	2,14 $\pm$ 0,36
6000 r	734	54	7,35 $\pm$ 0,86

die Signalgene enthalten (für das X-Chromosom die Kombination X-ple) aus ähnlichen Bestrahlungsversuchen (1500 r, 3000 r und 6000 r mittelharter Röntgenstrahlen) zusammengefaßt. Es handelt sich hierbei um Inversionen, Deletionen und Translokationen. Wie aus der Tabelle klar zu ersehen ist,

zeigen die Chromosomenmutationen eine deutliche nichtlineare Dosisproportionalität, die sich statistisch nicht von einer quadratischen unterscheidet: bei Verdoppelung der Dosis wird die Chromosomenmutationsrate fast genau vervierfacht. Die absoluten Werte der Chromosomenmutationen liegen, auch bei der höchsten Dosis, weit unter denen der Letalfaktoren.

### 3. Diskussion.

Die vorhin beschriebenen Versuche haben gezeigt, daß sichere Punktmutationen, die nichtletalen „sichtbaren“ geschlechtsgebundenen Mutationen von *Drosophila melanogaster*, eine direkte Proportionalität zur Bestrahlungsdosis aufweisen. Sichere Chromosomenmutationen weisen eine fast quadratische Proportionalität zur Dosis auf. Die geschlechtsgebundenen Letalfaktoren verhalten sich diesbezüglich wie Punktmutationen. Die Verhältnisse der verschiedenen Mutationsformen zur Bestrahlungsdosis gehen besonders klar aus der graphischen Darstellung der Abb. 1 hervor.

Wie anfangs erwähnt wurde, stellen die durch Röntgenbestrahlung ausgelösten Letalfaktoren ein Gemisch von Punkt- und Chromosomenmutationen dar (SACHAROV 1938, dort auch weitere Literatur); dieses ist sichergestellt, obwohl der Prozentsatz von Chromosomenmutationen in dem daraufhin von verschiedenen Autoren cytologisch untersuchten Letalfaktorenmaterial ziemlich stark schwankt. Das letztere, nämlich die Schwankungen des relativen Anteils von Chromosomenmutationen unter strahleninduzierten Letalfaktoren, ist leicht verständlich, da, wie wir gesehen haben, mit Ansteigen der Bestrahlungsdosen, die Rate von Chromosomenmutationen wesentlich schneller als die der Punktmutationen ansteigt; deshalb muß der Anteil von Chromosomenmutationen im untersuchten Satz von Letalfaktoren wesentlich davon abhängen, mit wie hohen Dosen die Hauptmenge der Letalfaktoren ausgelöst wurde.

Weshalb wird aber die Dosisproportionalitätskurve der Letalfaktoren durch den mit Erhöhung der Dosis immer größer werdenden Anteil von Chromosomenmutationen nicht gestört? Bei Dosen, die unter 4000 r liegen ist dieses verständlich, da die absolute Rate der Chromosomenmutationen im Vergleich zu der Gesamtrate der Letalfaktoren bei nicht allzu hohen Dosen gering ist; bei 6000 r macht sie aber immerhin etwa 40% der gesamten Letalfaktorenrate aus. Nun muß aber in Betracht gezogen werden, daß nicht alle von uns registrierten Chromosomenmutationen als geschlechtsgebundene Letalfaktoren wirken; nur die Deletionen des X-Chromosoms äußern sich fast hundertprozentig als

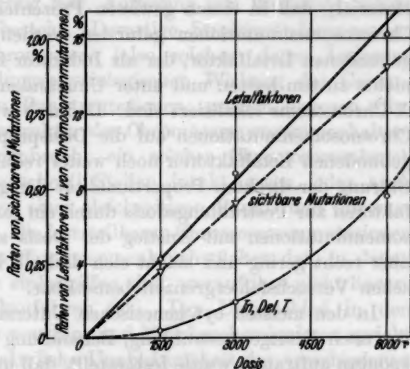


Abb. 1. Graphische Darstellung der direkten Proportionalität zur Röntgenbestrahlungsdosis der letalen und „sichtbaren“ geschlechtsgebundenen Mutationen, und der fast quadratischen Dosisproportionalität der Aberrationen des X-Chromosoms (Inversionen, Deletionen und Translokationen) bei *Drosophila melanogaster*.

geschlechtsgebundene Letalfaktoren; ein Teil der Inversionen ist homozygot lebensfähig, was auch für einige Translokationen gilt; und viele weitere Translokationen, obwohl sie lebensunfähige Hyper- bzw. Hypoploidie erzeugen, wirken sich als nichtgeschlechtsgebundene Letalfaktoren aus. Dadurch muß der Anteil der Chromosomenmutationen an der Rate geschlechtsgebundener Letalfaktoren auch bei hohen Dosen noch etwa um die Hälfte reduziert werden. Schließlich zeigten einige sorgfältige cytologische Untersuchungen (BAUER, unveröffentlichtes Material), daß in einem gewissen Prozentsatz von Fällen verschiedene Chromosomenmutationen gefunden werden, die mit dem geschlechtsgebundenen Letalfaktor, der als Indikator für die Untersuchung diente, nichts zu tun hatten und unter Umständen an einer anderen Stelle des X-Chromosoms lokalisiert sind. Dadurch wird der störende Einfluß der Chromosomenmutationen auf die Dosisproportionalität der geschlechtsgebundenen Letalfaktoren noch weiter reduziert. Alles in allem ist eine Störung der direkten Proportionalität der geschlechtsgebundenen Letalfaktoren zur Bestrahlungsdosis durch ein rasches Ansteigen der Chromosomenmutationen mit Anstieg der Dosis sicherlich vorhanden; sie ist aber recht gering und macht sich deshalb kaum außerhalb der statistischen Versuchsfehlergrenzen bemerkbar.

In den meisten cytogenetischen Untersuchungen von Letalfaktoren, die nach Röntgenbestrahlung, Behandlung mit anderen Agentien, oder spontan auftraten, wurde festgestellt, daß unter spontanen Letalfaktoren und solchen die durch chemische und ähnliche Beeinflussungen erzeugt wurden, der Anteil der Chromosomenmutationen wesentlich geringer als unter den röntgeninduzierten ist. Daraus wurde auf eine qualitativ verschiedene Beeinflussung des Mutationsvorganges durch ionisierende Strahlungen einerseits und z. B. Chemikalien andererseits geschlossen. Ohne die Möglichkeit eines solchen Unterschiedes a priori leugnen zu wollen, muß aber darauf hingewiesen werden, daß derartige Schlußfolgerungen nur dann berechtigt sind, wenn man ein Letalfaktorenmaterial cytogenetisch vergleicht, das aus Versuchen mit ungefähr gleichen Totalmutationsraten stammt; denn, wie wir gesehen haben, sinkt der relative Anteil von Chromosomenmutationen mit Verringerung der Bestrahlungsdosis recht schnell ab.

Diese Frage muß somit einer Revision unterzogen werden, was sich sehr lohnen würde im Hinblick auf die letzte von den anfangs gestellten Teilfragen des Gesamtproblems, nämlich der über den Vergleich der Natur und des Mechanismus der Entstehung von Punkt- und Chromosomenmutationen. Auf der einen Seite sahen wir, daß eine gewisse Unabhängigkeit der Chromosomen- und Punktmutationen sicherlich besteht. Andererseits darf nicht vergessen werden, daß die bei *Drosophila* genetisch feststellbaren Chromosomenmutationen eine Kombination von zumindest zwei Elementarereignissen (Chromosomenbrüchen) darstellen. Die wenigen in letzter Zeit durchgeführten Versuche, in denen es

gelingt einen Chromosomenbruch in seinem Verhältnis zur Bestrahlungsdosis und Wellenlänge der Strahlung zu analysieren (BAUER und WESCHENFELDER 1938; BAUER, im Druck; EBERHARD, im Druck; KHVOSTOVA und GAVRILOVA 1935, 1938), zeigten, daß zwischen den physikalischen Primäreignissen die zu einer Punktmutation und zu einem Chromosomenbruch führen eine große Ähnlichkeit besteht: beide werden durch eine Ionisation erzeugt. Es kann deshalb als Arbeitshypothese angenommen werden, daß in beiden Fällen das Primäreignis in einer Umgruppierung bzw. Auflösung von Bindungen innerhalb eines Atomverbandes besteht. Derartige Strukturänderungen an „genischen“ Stellen des Chromosoms (also solchen, deren Änderung eine Änderung der entwicklungsphysiologischen Wirkung des Genoms zur Folge haben) führen zu Punktmutationen; werden dagegen Bindungen gelöst, die die Längsstruktur des Chromosoms zusammenhalten, so entsteht ein Chromosomenbruch; ein solcher Chromosomenbruch kann die benachbarten „genischen“ Stellen intakt lassen, oder auch ändern bzw. zerstören, was zu einer gleichzeitigen Punkt- und Chromosomenmutation führen kann. Die feststellbaren Chromosomenmutationen stellen Umgruppierungen von Chromosomenbruchstücken dar, in denen mindestens zwei Bruchstellen einbegriffen sind, worauf ihre nicht lineare Dosisproportionalität zurückzuführen ist. Der Unterschied in den Dosisproportionalitätskurven von Ein- und Mehrbruchereignissen spricht weiterhin sehr für die grundsätzliche Unabhängigkeit der verschiedenen Brüche voneinander; also für die STADLERSche Bruch- (STADLER 1932, 1936) und gegen die Kontakthypothese (DUBININ 1930, DUBININ und KHVOSTOVA 1935, SEREBROVSKY 1929); wobei allerdings aus der nicht ganz quadratischen Dosisproportionalität der Zweibruchereignisse ein gewisser Einfluß eines weiteren Faktors, vielleicht gerade des Kontaktmechanismus, hervorzugehen scheint.

Die vorhin entwickelten Ansichten stellen selbstverständlich nur einen Erklärungsversuch in erster Annäherung dar und können lediglich als Arbeitshypothese für weitere Versuche benutzt werden. Das Problem über die Beziehungen von Punkt- und Chromosomenmutationen wird durch weitere Analysen des Entstehungsmechanismus von Chromosomenaberrationen und durch sorgfältige cytogenetische Untersuchungen des spontanen und induzierten Mutationsmaterials in absehbarer Zeit wesentlich gefördert werden. Erst dann wird man genaueres über diese Beziehungen, sowohl wie über die relative Bedeutung und Natur des Positionseffektes aussagen können.

#### Zusammenfassung.

1. Die Raten geschlechtsgebundener Letalfaktoren und sichtbarer Mutationen sind den Röntgenbestrahlungsdosen direkt proportional.

2. Genetisch feststellbare Aberrationen des X-Chromosoms steigen fast quadratisch mit der Dosis an.

3. Dadurch, daß auch bei höheren Dosen die Chromosomenmutationsrate wesentlich geringer als die Gesamtrate der Letalfaktoren ist, und daß nur ein Teil der Chromosomenmutationen sich als geschlechtsgebundene Letalfaktoren benimmt, wird die Dosisproportionalität der geschlechtsgebundenen Letalfaktoren nicht wesentlich durch den Anstieg der Chromosomenmutationsrate gestört.

4. In der Diskussion werden einige allgemeinere Fragen über die Beziehungen der Punkt- und Chromosomenmutationen gestreift.

#### Literatur.

- Bauer, H.: Cytogenetik. Fortschr. Zool. N. F. 1 (1937); 3 (1938). — Die Chromosomenmutationen. Z. Abstammungslehre 76 (1939). — Röntgenauslösung von Chromosomenmutationen bei *Drosophila melanogaster*. Chromosome 1 (1939) im Druck. — Bauer, H., M. Demerec und B. Kaufmann: X-ray induced chromosomal alterations in *Drosophila melanogaster*. Genetics 23 (1938). — Bauer, H. u. R. Weschenfelder: Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses in der F<sub>1</sub> nach Röntgenbestrahlung von *Drosophila*. Naturwiss. 26 (1938). — Belgovskij, M.: Dependence of translocation frequency in *Drosophila* upon the X-ray dosage. Biol. Žurn. 6 (1937). — Catcheside, D. G.: The effect of X-ray dosage upon the frequency of induced structural changes in the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. J. Genet. 36 (1938). — Demerec, M.: The effect of X-ray dosage on sterility and number of lethals in *Drosophila*. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 19 (1933). — Dobzhansky, Th.: Induced chromosomal aberrations in animals. Biol. Effects Radiation 2 (1936). — Dubinin, N. P.: On the nature of artificially deleted chromosomes. Žurn. eksper. Biol. (russ.) 7 (1930). — Dubinin, N. P. and V. Khvostova: The mechanism of the formation of complex chromosome rearrangements. Biol. Žurn. 4 (1935). — Eberhard, K.: Über den Mechanismus strahleninduzierter Chromosomenmutationen bei *Drosophila*. Chromosoma 1 (1939) (im Druck). — Efrimson, W. P.: Die transmutierende Wirkung der X-Strahlen. Biol. Zbl. 51 (1931). — Heptner, M. and Z. Demidova: Relation between the dosage of X-rays and mutations of single genes in *Drosophila*. Biol. Žurn. 5 (1936). — Khvostova, V. and A. Gavrilova: A new method for discovering translocations. Biol. Žurn. 4 (1935). — Relation between the number of translocations in *Drosophila* and the dosages of X-rays. Biol. Žurn. 7 (1938). — Muller, H. J.: Further studies on the nature and causes of gene mutations. Proc. 6. internat. Congr. Genet. 1 (1932). — The remaking of chromosomes. The Collecting Net 13 (1938). — Muller, H. J. and E. Altenburg: The frequency of translocations produced by X-rays in *Drosophila*. Genetics 15 (1930). — Oliver, C. P.: An analysis of the effect of varying the duration of x-ray treatment upon the frequency of mutations. Z. Abstammungslehre 63 (1932). — Sacharov, V. V.: On the specificity of the action of the factors of mutation. Biol. Žurn. 7 (1938). — Sax, K.: Chromosome aberrations induced by X-rays. Genetics 23 (1938). — The time-factor in X-ray production of chromosome aberrations. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 25 (1939). — Serebrovsky, A.: A general scheme for the origin of mutations. Amer. Nat. 63 (1929). — Stadler, L. J.: On the genetic nature of induced mutations in plants. Proc. 6. internat. Congr. Genet. 1 (1932). — The nature of mutations. Collect. Net. 11 (1936). — Stubbe, H.: Spontane und strahleninduzierte Mutabilität. Leipzig: Georg Thieme 1937. — Timofëeff-Ressovsky, N. W.: Experimentelle Mutationsforschung in der Vererbungslehre. Dresden: Theodor Steinkopff 1937. — Le mécanisme des mutations et la structure du gène. Paris: Hermann 1939. — Timofëeff-Ressovsky, N. W. u. M. Delbrück: Strahlen genetische Versuche über sichtbare Mutationen und die Mutabilität einzelner Gene bei *Drosophila*. Z. Abstammungslehre 71 (1936).



(Aus der genetischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts in Berlin-Buch.)

# ÜBER DEN MECHANISMUS STRAHLENINDUZIRTER CHROMOSOMENMUTATIONEN BEI DROSOPHILA MELANOGASTER<sup>1</sup>.

Von

K. EBERHARDT.

Mit 8 Textabbildungen (11 Einzelbildern).

(Eingegangen am 22. September 1939.)

## Inhaltsverzeichnis.

	Seite
1. Einleitung . . . . .	317
2. Material und Methodik . . . . .	319
3. Versuchsergebnisse . . . . .	323
a) Mutationsrate und Strahlendosis . . . . .	323
b) Mutationsrate und Wellenlänge der Strahlen . . . . .	325
c) Mutationsrate und Zeitfaktor . . . . .	327
4. Diskussion . . . . .	329
Zusammenfassung . . . . .	334
Literaturverzeichnis . . . . .	334

## 1. Einleitung.

Die Mutationsforschung hat sich in den letzten 10—15 Jahren zu einem rasch aufstrebenden Teil der Genetik entwickelt, da die Entdeckung, Mutationen durch Röntgenstrahlen zu erzeugen, Anlaß zu zahlreichen Versuchen gab. Die Untersuchungen sollten vor allem Licht auf den Entstehungsmechanismus einer Genmutation werfen; die strahleninduzierte Erzeugung von Chromosomenaberrationen aber, speziell eine quantitative Auswertung der Ergebnisse, trat bis vor wenigen Jahren noch stark in den Hintergrund. In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, den Entstehungsmechanismus einer Chromosomenmutation zu klären. Dabei ist die Erforschung des Primäreignisses, das allein, oder erst über sekundäre Vorgänge, einen Chromosomenbruch bewirken kann, von besonderer Bedeutung. Neben biophysikalischen Betrachtungen werden sich noch solche cytologischer Natur ergeben, denn viele Chromosomenmutationen stellen komplizierte Umordnungen innerhalb des Kerns dar.

Eine Mutation kann die Änderung eines einzelnen Gens (Genmutation), einen strukturellen Umbau innerhalb eines oder mehrerer Chromosomen (Chromosomenmutation) oder eine Abweichung von der normalen Artzahl der Chromosomen darstellen. Diese drei Mutationstypen können alle spontan auftreten und bilden somit die Basis für die genotypische Variation und die Differenzierung neuer Rassen und Arten.

<sup>1</sup> D. 11.

Begrifflich ergibt sich wohl eine klare Trennung in drei Gruppen; tatsächlich aber läßt sich einstweilen nur zwischen den Gen- und Chromosomenmutationen einerseits und den Genommutationen andererseits ein voll gültiger Unterschied feststellen, nicht aber zwischen den ersten beiden. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß sich erstens kleine chromosomale Umlagerungen wie neue mendelnde Gene verhalten und daß zweitens die Lage der Gene für deren Manifestierung von großem Einfluß sein kann. Die Vermutung, daß alle Genmutationen kleine bis kleinste chromosomale Umlagerungen sind, scheint jedoch vor weiteren exakten cytogenetischen Versuchen als zu weit gefaßt.

Auslösungsversuche von Genmutationen haben ergeben, daß die niedrige spontane Mutationsrate durch Röntgen- oder Radiumbestrahlung stark erhöht werden kann. Die exakte quantitative Auswertung der Versuchsergebnisse ergab, daß sich die Mutationsrate direkt proportional zur Strahlendosis verhält, ferner, daß sie wellenlängen- und zeitfaktorunabhängig ist. Die direkte Proportionalität der Mutationsrate zur Strahlendosis zeigt nach der Treffertheorie der biologischen Wirkungen kurzwelliger Strahlung, daß zum Mutieren eines Gens ein Treffer hinreicht. Die Art dieses Treffers kann aber nur in einer Ionisation oder Atomanregung bestehen, da die Höhe der Mutationsrate nur von der Anzahl der gebildeten Ionenpaare abhängt und die Absorption eines Strahlenquants oder der Durchgang eines Sekundärelektrons als Trefferereignis hiermit ausscheidet (TIMOFÉEFF-RESSOVSKY 1939, hier die weitere Literatur). Die oft beobachtete Gleichartigkeit von Hin- und Rückmutation legt die Annahme nahe, daß die Auslösung einer Mutation in einem Elementarprozeß besteht und daß nicht erst weitere sekundäre chemische Umsetzungen durch diesen angeregt werden müssen, denn eine einfache Umkehrbarkeit wäre beim Auftreten von sekundären Reaktionen kaum denkbar. — Diese weit ausgearbeiteten Ergebnisse über den Entstehungsmechanismus strahleninduzierter Genmutationen werden für die Auswertung unserer Versuche als Vergleichsmaterial von großer Bedeutung sein, doch spielen neben dem Problem des Primärereignisses noch andere Umstände mit, welche die Verhältnisse erheblich komplizierter gestalten.

Folgende Faktoren müssen neben der Beurteilung des primären Auslösungsvorganges mit in Betracht gezogen werden: 1. An jeder genetisch erfaßten Chromosomenmutation sind zwei Primärereignisse beteiligt, denn nur die sich aus zwei Brüchen ergebenden Umlagerungen sind lebensfähig. 2. Die räumliche Lagerung der Chromosomen ist für die Neugruppierung von beträchtlicher Bedeutung, denn es darf wohl kaum eine vollkommene Bewegungsfreiheit der Chromosomen oder deren Fragmente und somit eine ganz freie Kombinationsmöglichkeit vermutet werden. 3. Viele Chromosomenmutationen wirken für die Zelle entweder unmittelbar letal oder die betroffenen Zellen werden bei den folgenden Teilungen eliminiert.

Besonders die Punkte 2 und 3 gestalten die Verhältnisse ungünstig, da sie in keinerlei Weise in irgendwelchen mathematischen Größen oder Formeln ausgedrückt werden können. Die Schwierigkeit des Punktes 1 allein läßt sich hingegen durch rein mathematische Überlegungen beseitigen.

Neben der Klärung des Elementareffektes ist die Frage nach der räumlichen Beziehung zwischen den an der Umlagerung beteiligten Chromosomenabschnitten von Bedeutung. Sie wird von zwei Hypothesen erörtert: 1. SEREBROVSKY: Kontakthypothese (Crossing-over-Hypothese) nimmt ein Aneinanderheften zweier nichthomologer Chromosome, einen Doppelbruch an der Berührungsstelle und wechselseitige Wiedervereinigung der Bruchstücke an. 2. Nach STADLERS Bruchhypothese treten primär freie Bruchstücke auf, die sich sekundär zufallsmäßig neu kombinieren.

Nach den bisherigen Untersuchungen scheint sich STADLERS Bruchhypothese als richtig zu erweisen. Ihre stärkste Stütze besteht wohl im cytologischen Nachweis von freien Bruchstücken, die neben reziproken Verlagerungen auftreten (SAX, BAUER).

Die Fragmente haben aber anscheinend nicht freie Kombinationsmöglichkeit, denn es müßten sich im Falle einer solchen oft Rekombinationen von mehreren Bruchstücken ergeben. Tatsächlich aber kombinieren sich bei mehreren Brüchen die Fragmente meistens paarweise und die Rekombinationen mit mehreren Bruchstücken treten zahlenmäßig weit hinter der bei Unabhängigkeit zu erwartenden Häufigkeit zurück (BAUER, DEMEREC und KAUFMANN 1938).

Die im folgenden dargestellten Versuche sind von der Frage bestimmt, ob der Mechanismus bei der Auslösung einer Chromosomenmutation ähnlich oder gleich dem bei der Entstehung einer Genmutation ist. Die Lösung dieses Problems kann nur mit einer entsprechend gewählten Analyse- und Untersuchungsmethode erreicht werden, welche die aufgezeigten Schwierigkeiten möglichst beseitigt.

## 2. Material und Methodik.

Die zuerst angewandten Methoden, Translokationen auf genetischem Wege festzustellen, bestanden im Nachweis geänderter Koppelungsverhältnisse. Prinzipiell wird in der Weise vorgegangen, daß bestrahlte Männchen mit Weibchen gekreuzt werden, die in jedem Chromosom homozygot ein leicht erkennbares, sog. Markierungsgen besitzen. Die  $F_1$ -Tiere werden mit letzteren rückgekreuzt und aus den nun auftretenden Koppelungsverhältnissen der eingeführten Gene kann auf entsprechende Translokationen geschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode benutzt, die auf der Erscheinung der Lagewirkung der Gene (Positionseffekt) beruht (KHOVOSTOVA und GAVRILOVA 1935). Im IV. Chromosom von *Drosophila*

*melanogaster* liegt das Gen „*cubitus interruptus*“ (*ci*), dessen rezessives Allel eine Unterbrechung einer Flügelader bewirkt (Abb. 1). Wenn bei heterozygoten Tieren in der Nähe des normalen Allels ein Chromosomenbruch mit nachträglicher Anheftung anderen Chromosomenmaterials

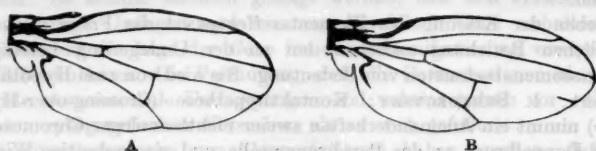


Abb. 1A und B. A Normaler Flügel von *Drosophila melanogaster*. B Flügel mit dem Merkmal *cubitus interruptus* (*ci*).

stattgefunden hat, so wird durch diese Umlagerung die Dominanz des normalen Allels soweit geschwächt, daß sich dann das sonst rezessive

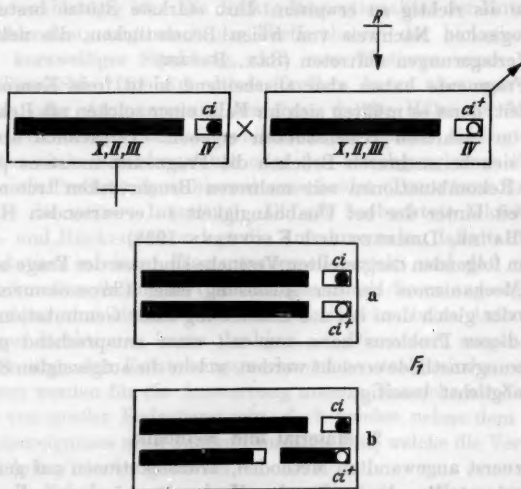


Abb. 2. Kreuzungsschema zur Feststellung der Translokationen zwischen dem IV. und einem der anderen drei Chromosomen mittels des Positionseffektes. a heterozygot für *ci*, phänotypisch normal, b Beispiel eines Translokationsindividuums, heterozygot für *ci*, aber phänotypisch *ci*.

Allel manifestieren kann. Die nun auftretende Flügeladerunterbrechung ist oft nur ganz schwach ausgeprägt, aber immer klar zu erkennen. Es werden also normale Männchen bestrahlt und diese mit homozygoten *ci*-Weibchen<sup>1</sup> gekreuzt (Abb. 2); in der F<sub>1</sub>-Generation erscheinen neben

<sup>1</sup> Unsere Weibchen waren außerdem homozygot für *ey*, was jedoch für den Positionseffekt belanglos ist.

den phänotypisch normalen Individuen (a) auch einzelne Tiere mit Flügeladerunterbrechungen, die dann auf eine Umlagerung im IV. Chromosom hinweisen (b). Für die Manifestierung des Gens *ci* ist von Wichtigkeit, daß der Bruch in der Nähe des normalen Allels, am proximalen Chromosomenende stattgefunden hat und daß das angeheftete Material nicht aus einer inerten, sondern genisch aktiven Region eines anderen Chromosoms stammt (DUBININ, SOKOLOV, TINIAKOV 1935).

DUBININ und SIDOROV (1934) haben auf exakte Weise gezeigt, daß die beschriebene Erscheinung tatsächlich nur auf die Lagewirkung zurückzuführen ist und daß nicht etwa eine Mutation des normalen Allels zum rezessiven stattgefunden hat. Individuen, die homozygot für die Translokation waren, erwiesen sich als vollkommen normal, ebenso Haplo-IV-Tiere, deren einziges IV. Chromosom eine Translokation eingegangen war.

Aus der  $F_1$ -Generation der ersten Bestrahlungsversuche wurden alle und aus den folgenden einzelne *ci*-Tiere zur Analyse mit Hilfe der Kopplungsmethode herangezogen. Die *ci*-Ausnahmемännchen wurden mit Weibchen folgenden Genotyps gekreuzt:  $\overline{yy}$ , *bw/bw*, *e/e*, *ey/ey*. Die  $F_1$ -Männchen mit normalen Augen wurden dann mit Weibchen vorigen Genotyps rückgekreuzt. Die  $F_2$ -Individuen hatten je nach der Art der Translokation folgenden Phänotyp:

Translokation 1—4: Männchen nicht *eyeless*, Weibchen *eyeless*;

Translokation 2—4: alle Tiere entweder nicht *brown*, nicht *eyeless* oder *brown* und *eyeless*;

Translokation 3—4: alle Tiere entweder nicht *ebony*, nicht *eyeless* oder *ebony* und *eyeless*.

In Tabelle 1 ist die zahlenmäßige Auswertung einiger Translokationen gezeigt. Nach der genetischen Überprüfung folgte mit Hilfe der Speicheldrüsenchromosomenmethode die cytologische Untersuchung an Stichproben.

Tabelle 1. Genetische Analyse einiger Translokationen, die den Positionseffekt am Locus *ci* zeigen.

*ci*-Ausnahmемännchen wurden mit  $\overline{yy}$ ; *bw/bw*; *e/e*; *ey/ey*-Weibchen gekreuzt und Männchen der  $F_1$  mit Weibchen vorigen Genotyps rückgekreuzt (6 Beispiele).

Phänotyp der $F_1$ -Tiere	Zahlenmäßiges Auftreten der $F_2$ -Tiere, je nach Art der Translokation					
	$T_{1-4}$		$T_{1-4}$	$T_{1-4}$	$T_{1-4}$	$T_{1-4}$
	♀	♂				
<i>bw</i> , <i>e</i> , <i>ey</i>	52	—	48	62	76	120
<i>bw</i> , <i>e</i> , +	—	73	—	—	—	—
<i>bw</i> , +, <i>ey</i>	55	—	45	—	—	—
<i>bw</i> , +, +	—	60	—	97	104	140
+, <i>e</i> , <i>ey</i>	48	—	—	75	76	93
+, <i>e</i> , +	—	51	80	—	—	—
+, +, <i>ey</i>	51	—	—	—	—	—
+, +, +	—	63	76	84	115	99

Die Positionseffektmethode weist einen großen Vorteil den anderen Feststellungsmöglichkeiten gegenüber auf, denn es wird mit ihr nur eine ganz bestimmte, relativ scharf abgegrenzte Region des gesamten Chromosomenmaterials untersucht. Bei der Anwendung der Koppelungsmethode werden alle jene Translokationen erfaßt, die überhaupt zwischen den betreffenden Chromosomen stattfinden; in unserem Falle aber wird immer nur ein bestimmter Bruch im IV. Chromosom registriert und der zweite Bruch, der an beliebiger Stelle in einem anderen Chromosom stattfinden

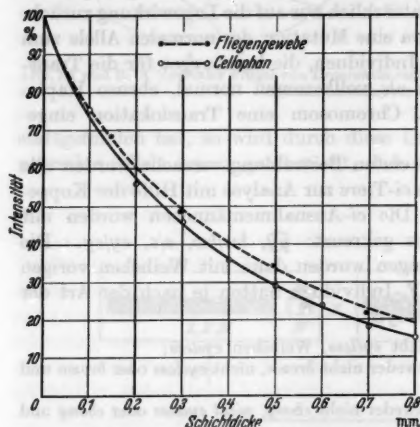


Abb. 3. Absorption der Grenzstrahlen in Cellophan und Fliegengewebe.

kann, hat hierbei für die Höhe der Mutationsrate keine oder nur wenig Bedeutung. Die Erklärung ist durch folgende Überlegung gegeben: Durch Bestrahlung entstehen zweifellos sehr viele Chromosomenbrüche, die Mehrzahl hiervon findet im X-Chromosom und in den großen Autosomen statt und nur ein ganz geringer Prozentsatz wird in der Nähe des Locus *ci* liegen. Beim Entstehen von reziproken Positionseffekt-Translokationen kombinieren sich somit Brüche mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit mit solchen sehr großer Wahrscheinlichkeit (BAUER 1939; BAUER, DEMEREC und KAUFMANN 1938). Wenn sich zwei voneinander unabhängige Primäreignisse, in diesem Falle Brüche, zu einem Sekundäreignis vereinigen, so ergibt sich die Häufigkeit des Sekundäreignisses (*ci*-Translokation) aus dem Produkt der beiden Wahrscheinlichkeiten der Primäreignisse. Ist aber, wie in unserem Falle, die Wahrscheinlichkeit des einen sehr groß, also nahe 1 bei allen in Frage kommenden Dosen, so ist die Häufigkeit der *ci*-Translokation allein durch die Wahrscheinlichkeit des zweiten, weniger häufigen Primäreignisses (Bruch am Locus *ci*) bestimmt. Die mit unserer Methode gefundenen Mutationsraten gestatten also unmittelbare Schlußfolgerungen in bezug auf das Primäreignis, das einen Chromosomenbruch auslöst. Die so gefundenen Werte lassen eine einfachere Beurteilung zu als jene, bei denen man auf Grund einer anderen Analyseermethode (Koppelungsmethode) die eine von den beiden Bruchwahrscheinlichkeiten nicht einfach außer acht lassen darf.

Die Röntgenbestrahlungsversuche wurden mit zwei verschiedenen Strahlenqualitäten durchgeführt: mittelharten Röntgenstrahlen (Halbwertschicht 1,35mm



Cu) und ganz weichen Röntgenstrahlen, sog. Grenzstrahlen (HWS 0,25 mm Cellophan).

Die Grenzstrahlen werden stark auch in dünnen Gewebeschichten absorbiert. Deshalb mußten Absorptionsversuche in Gewebe und Cellophan durchgeführt werden, deren Ergebnisse graphisch in den Abb. 3 und 4 dargestellt sind. Aus den Absorptionskurven der Abb. 3 kann die Tiefendosis berechnet werden, die in die Gonaden der bestrahlten Fliegen eindringt (Näheres darüber wird bei der Beschreibung der entsprechenden Versuche angegeben). Die Abb. 4 zeigt, daß sich beim Auftragen der Absorptionskurve auf ein logarithmisches Raster eine Gerade ergibt;

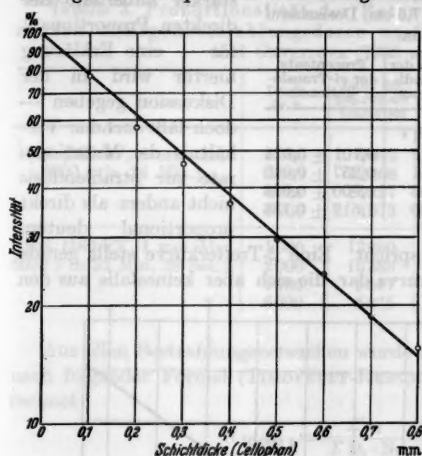


Abb. 4.

Abb. 4. Logarithmische Darstellung der Absorptionskurve der Abb. 3.

Abb. 5A und B. Bestrahlungskapseln. A für mittelharte und harte Röntgenstrahlen, B für ganz weiche Röntgenstrahlen (Grenzstrahlen) in der Aufsicht und im Querschnitt. CI 0,02 mm dicke Cellophanschicht.

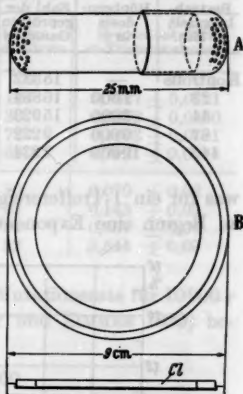


Abb. 5A und B.

daraus muß auf genügende Homogenität der benutzten Strahlung geschlossen werden. Um überflüssige Absorption der Grenzstrahlen zu vermeiden, wurden die Fliegen in flachen Holzbehältern, deren Deckel mit 0,02 mm dickem Cellophan bespannt war, bestrahlt (Abb. 5). Bei Bestrahlungen mit harter Röntgenstrahlung wurden große, durchlöchernte, medizinische Gelatine kapseln benutzt (Abb. 5). Um unkontrollierbare Streustrahlung zu vermeiden, wurden die Bestrahlungen in 1 m freiem Luftraum durchgeführt.

Alle Dosen wurden in r-Einheiten mittels eines sorgfältig geeichten Ionognom-Dosimeters gemessen, dessen Ionisationskammer auch für die Messung von Grenzstrahllosen in r-Einheiten geeignet ist. Die äquivalente Dosierung harter und weicher Strahlen wurde von Herrn Dr. K. G. ZIMMER kontrolliert, wofür ich ihm auch hier bestens danken möchte.

### 3. Versuchsergebnisse.

#### a) Mutationsrate und Strahlendosis.

In Tabelle 2 sind die Versuchsergebnisse zahlreicher einzelner Bestrahlungen zur Auslösung von Translokationen zusammengestellt, die

durch harte Röntgenstrahlen erzeugt und durch den *ci*-Positionseffekt erfaßt wurden. Wie sich aus Abb. 6 ersehen läßt, ergab sich eine

Tabelle 2. Proportionalität der Raten von *ci*-Translokationen zu den Röntgenbestrahlungsdosen.

Es wurden normale Männchen bestrahlt und mit *ci/ci*-Weibchen gekreuzt. Bestrahlungsbedingungen: 180 kV (eff), 5 mA, 1 mm Cu-Filter, HWS = 1,35 mm Cu, Abstand Fokus-Kapselmitte 17,5 cm, Dosiszulauf in 17,5 cm: 69 r/min.

Bestrahlungszeit in Min.	Röntgendosis in r	Zahl der geprüften Gameten	Zahl der <i>ci</i> -Individuen	Prozentsatz der <i>ci</i> -Translokationen
Kontrolle	—	15332	1 <sup>1</sup>	
22	1500	16884	17	$0,101 \pm 0,024$
44	3000	15923	41	$0,257 \pm 0,040$
87	6000	9222	83	$0,900 \pm 0,098$
145	10000	7934	120	$1,512 \pm 0,136$

direkte Proportionalität zwischen Mutationsrate und Bestrahlungsdosis. Einzelne Werte fallen mit ihren Fehlergrenzen stärker außerhalb der direkten Proportionalität — eine Erklärung hierfür wird in der Diskussion gegeben — doch läßt sich das Verhältnis der Mutationsrate zur Strahlendosis nicht anders als direkt proportional deuten,

was für ein 1-Trefferereignis spricht. Eine 2-Trefferkurve stellt gerade zu Beginn eine Exponentialkurve dar, die sich aber keinesfalls aus den

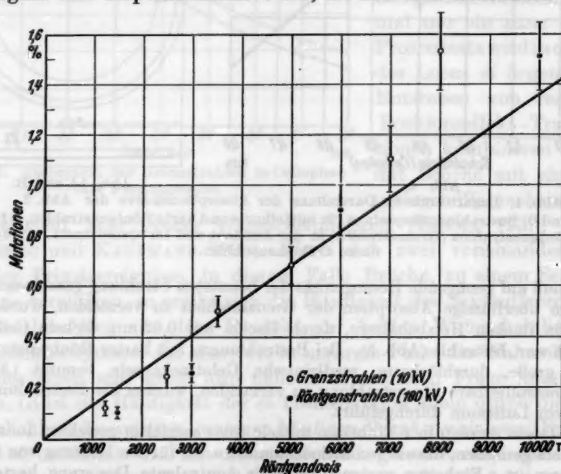


Abb. 6. Direkte Proportionalität der Raten von *ci*-Translokationen zu den Röntgenstrahlungsdosen und Vergleich der mutationsauslösenden Wirkung von Grenzstrahlen und mittelharten Röntgenstrahlen bei *Drosophila melanogaster*.

gefundenen Werten ergeben kann, da dann die Mutationsrate im Quadrat zur Strahlendosis ansteigen müßte.

<sup>1</sup> Unter dem Kontrollmaterial trat nur ein Männchen mit dem Merkmal *ci* auf. Dieses Individuum konnte aber nicht weiter untersucht werden, da es sich als steril erwies.

KHVOSTOVA und GAVRILOVA (1935 und 1938) haben bereits ähnliche Dosisversuche durchgeführt (Tabelle 3). Die von diesen Autoren gefundenen Werte bei 6000 r sind wesentlich niedriger als die in dieser Arbeit festgestellten. Erst bei der Durchführung der Zeitfaktorversuche ergab sich der Grund hierfür. Es wird im Abschnitt über Mutationsrate und Zeitfaktor näher darauf eingegangen werden.

Tabelle 3. Proportionalität der Raten von *ci*-Translokationen zu den Röntgenbestrahlungsdosen nach Versuchen von KHVOSTOVA und GAVRILOVA (1935 und 1938).

	Dosis in r	Zahl der geprüften Gameten	Zahl der <i>ci</i> -Individuen	Prozentsatz der <i>ci</i> -Translokationen
1935 (180 kV, 1 mm Al., 6000 r in 24 Min.)	1000	9042	12	0,1327 ± 0,0121
	2000	12608	30	0,2379 ± 0,0430
	4000	14137	72	0,5093 ± 0,0191
	6000	8973	63	0,7021 ± 0,0774
1938 (180 kV, 1 mm Al., 6000 r in 33 Min. 36 Sek.)	1000	13680	10	0,070 ± 0,02
	2000	15388	22	0,143 ± 0,03
	4000	9511	34	0,357 ± 0,06
	6000	5875	32	0,544 ± 0,09

Aus allen Bestrahlungsversuchen wurde die Mutationsrate für 10000 r nach folgender Formel (TIMOFÉEFF-RESSOVSKY und ZIMMER 1939) berechnet:

$$\alpha_{10\,000\,r} = \frac{\sum n_i}{\sum D_i \cdot N_i} \cdot 10\,000$$

in der  $n_i$  die Zahl der aufgetretenen Mutationen,  $D_i$  die Werte der Röntgendosen und  $N_i$  die Zahl der untersuchten Individuen darstellt. Der so gefundene Punkt bestimmt die Neigung der Geraden.

#### b) Mutationsrate und Wellenlänge der Strahlen.

Versuche mit Strahlen verschiedener Wellenlänge können über das Wesen des Treffers und, unter bestimmten Bedingungen, auch über die relative Größe des Treffbereichs Aufschluß geben.

Um einen möglichst großen Wellenlängenunterschied im Vergleich zu den vorigen Versuchen zur Verfügung zu haben, wurden Grenzstrahlen, besonders weiche Röntgenstrahlen, benutzt, die bei einer Röhrenspannung von 10 kV entstehen.

Im Gegensatz zu den harten Röntgenstrahlen werden weiche Strahlen auch vom Gewebe stark absorbiert. Es mußte daher die die Spermien tatsächlich treffende Strahlenmenge bestimmt werden. Nach Messungen von STRASBURGER ist der Abstand der Hodenmitte von der Rückseite der Fliegen im Mittel 500  $\mu$  und von der Bauchseite etwa 150  $\mu$ . Die Fliegen, die in flachen Kapseln (Abb. 5) bestrahlt wurden, laufen darin zu 50–55% mit der Bauchseite nach oben und zu 45–50% mit der

Bauchseite nach unten herum. Aus diesen Zahlen und aus der Tiefenlagebestimmung der Hoden ließ sich die mittlere Tiefe der Gonaden während der Bestrahlung berechnen; sie beträgt etwa  $300 \mu$ . Schließlich mußte noch die Absorption der Grenzstrahlen im Fliegenewebe gemessen werden. Die verschieden dicken Schichten des Fliegenbreies ergaben eine ähnliche Absorptionskurve, wie die des Cellophans (Abb. 3). Aus der Kurve kann abgelesen werden, daß nur etwa die Hälfte der Strahlenmenge die Hoden trifft.

Für den Vergleich der Wirkung der Grenzstrahlen mit der der Röntgenstrahlen wurden abermals Versuche mit verschiedenen großen Dosen durchgeführt. Das Ergebnis zahlreicher Bestrahlungen ist in Tabelle 4 zusammengestellt und mit in Abb. 6 aufgenommen.

Tabelle 4. Proportionalität der Raten von *ci*-Translokationen zu den Dosen sehr weicher Röntgenstrahlen (Grenzstrahlen),

Es wurden normale Männchen bestrahlt und mit *ci/ci*-Weibchen gekreuzt. Bestrahlungsbedingungen: 10 kV; 10 mA; HWS = 0,25 mm Cellophan; Abstand Meßblende—Kapselmitte: 6 cm; Dosiszulauf in 6 cm 218 r/min. auf Oberfläche.

Bestrahlungszeit in Min.	Dosis in r		Zahl der geprüften Gameten	Zahl der <i>ci</i> -Individuen	Prozentsatz der <i>ci</i> -Translokationen
	Oberfläche	Tiefe			
11,5	2500	1250	14282	17	$0,118 \pm 0,029$
23	5000	2500	13521	33	$0,244 \pm 0,043$
32	7000	3500	12176	61	$0,501 \pm 0,061$
46	10000	5000	12249	83	$0,680 \pm 0,074$
64	14000	7000	6140	67	$1,091 \pm 0,133$
74	16000	8000	6680	102	$1,527 \pm 0,150$

Aus den festgestellten Mutationsraten, die sich bei harter und weicher Röntgenstrahlung ergeben, ist eine klare Wellenlängenunabhängigkeit ersichtlich. Dieses Ergebnis besagt, daß die Rate der ausgelösten Brüche nur von der Zahl der Ionisationen abhängt. Würde man nämlich andererseits die Absorption eines Strahlenquants als Treffer annehmen, so müßten bei harter Strahlung weniger Mutationen auftreten, da zur Erzeugung einer bestimmten Anzahl von Ionenpaaren (also pro gleiche Dosis) weniger Quanten harter Strahlung notwendig sind als solche weicher Strahlen. Nimmt man hingegen den Durchgang eines Sekundärelektrons durch einen empfindlichen Bereich als Treffer an, so müßte sich ebenfalls eine Wellenlängenabhängigkeit zeigen. Es kann sich dabei um folgende zwei Fälle handeln: 1. Falls die zur Erreichung des Effektes erforderliche Energie gering ist, so muß das Bestrahlungsergebnis bei härterer Strahlung, aber gleicher Dosis größer sein und die Proportionalitätskurve muß steiler ansteigen; dieses würde eintreten, da bei weicher Strahlung, wegen der zu großen Dichte der Ionisationen längs der Bahn des Sekundärelektrons, beim Durchgang des letzteren durch den Trefferbereich zuviele Ionisationen hinterlassen würden, von denen die meisten

überflüssig wären, wodurch sich ein „Sättigungseffekt“ ergeben müßte. 2. Falls die zur Erreichung des Effektes erforderliche Energie größer sein muß, so wird bei harter Strahlung die Ionisationsdichte längs der Sekundärelektronenbahn zu gering sein, um im empfindlichen Bereich genügend Energie zu hinterlassen; es wird also bei härterer Strahlung die Trefferzahl steigen müssen und die Form der Schädigungskurve muß sich mit der Wellenlänge ändern. Da auch diese beiden Schlußfolgerungen nicht zutreffen, zumal eine absolute Wellenlängenunabhängigkeit festgestellt wurde, muß angenommen werden, daß die Anzahl der Mutationen tatsächlich nur von der Zahl der erzeugten Ionisationen abhängt; somit kann die Folgerung des vorigen Abschnittes — ein Chromosomenbruch wird durch *einen* Treffer erzeugt — dahingehend erweitert werden, daß ein Treffer als eine *Ionisation* anzusehen ist.

### c) Mutationsrate und Zeitfaktor.

Zur Untersuchung des Entstehungsvorganges bei Chromosomenmutationen ist es von größter Wichtigkeit festzustellen, ob gleiche applizierte Dosen bei verschieden großer zeitlicher Verteilung denselben Effekt bewirken.

Diese Frage der Intensitätsabhängigkeit wurde bereits bei den verschiedensten biologischen Objekten gelöst, wobei einerseits eine Intensitätsunabhängigkeit, andererseits aber mit Verdünnung der Strahlung ein verminderter Effekt beobachtet werden konnte. Für letzteren Fall kann das Ausmaß, in dem die unvollständige Kumulation verdünnter bzw. fraktionierter Dosen sich geltend macht, durch einen Zahlenwert angegeben werden, der Zeitfaktor genannt wird und als die Zahl bezeichnet wird, mit der man die Dosis multiplizieren muß, um bei einer bestimmten Größe der Intensitätsänderung die gleiche Dosiswirkung zu erzielen. Ein Zeitfaktor, der also größer als 1 ist, bedeutet, daß die Dosenkumulation bei Verdünnung unvollständig ist.

Eine ausgesprochene Intensitätsunabhängigkeit wurde bei der Auslösung von Genmutationen und bei Strahlenreaktionen in Ruhe befindlicher biologischer Objekte (trockene Pflanzensamen, noch vor der Weiterentwicklung stehende Eier) festgestellt. Mit dem Einsetzen und dem Fortgang der Entwicklung aber steigt die Strahlenempfindlichkeit meist über wellenförmige Steigerungen stetig an, um dann nach Abschluß der Entwicklung wieder auf ein bestimmtes Maß zurückzugehen. Wichtig an diesen Änderungen der Radiosensibilität ist aber, daß damit auch konzentrierte Dosen einen weitaus größeren Effekt hervorrufen als verdünnte Dosen. Allgemein hat sich ergeben, daß die gesteigerte Wirkung bei höheren Intensitäten vom größeren Baustoffwechsel des Bestrahlungsobjektes abhängt. — Das Ergebnis der Intensitätsunabhängigkeit bei der Auslösung von Genmutationen stützt in gewissem Maße die

Tabelle 5. Abhängigkeit der Raten der *ci*-Translokationen von der Intensität der Bestrahlung.

Röntgendosis für alle Versuche: 6000 r. Es wurden normale Männchen bestrahlt und mit *ci/ci*-Weibchen gekreuzt.

Bestrahlungszeit	Zahl der geprüften Gameten	Zahl der <i>ci</i> -Individuen	Prozentsatz der <i>ci</i> -Translokationen
13,8 Min.	19020	113	$0,594 \pm 0,056$
22,7 „	22396	137	$0,612 \pm 0,051$
1 Std. 27 „	9222	83	$0,900 \pm 0,098$
2 „ 26 „	6701	65	$0,970 \pm 0,120$
4 „ 54 „	9731	95	$0,976 \pm 0,100$
9 „ 45 „	5084	73	$1,436 \pm 0,167$
21 „ 30 „	12696	149	$1,174 \pm 0,096$
2mal 7 Std. mit Pause von 41 Std.	7487	85	$1,135 \pm 0,122$

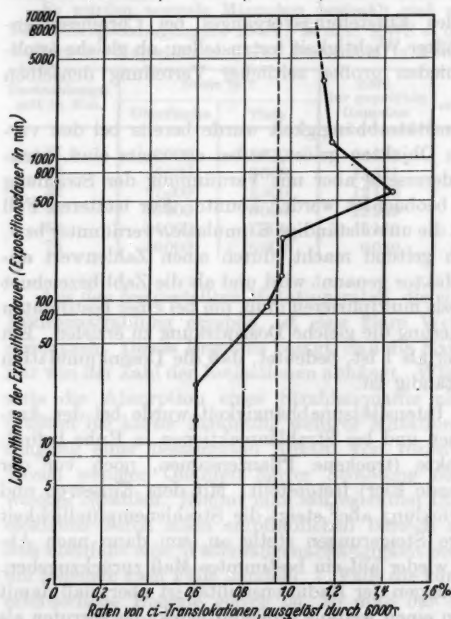


Abb. 7. Abhängigkeit der Raten der *ci*-Translokationen von dem Zeitfaktor in Röntgenbestrahlungsversuchen. In allen Versuchen wurde eine Gesamtdosis von 6000 r verabreicht; auf den Ordinaten ist die Expositionsdauer logarithmisch aufgetragen; die Abszisse stellt die Translokationsraten der einzelnen Versuche und die gestrichelte Vertikale — die mittlere Rate aus allen Versuchen dar.

sich aus der direkten Proportionalität und der Wellenlängenunabhängigkeit geschlossene Annahme, daß eine Genmutation durch eine Ionisation erzeugt wird.

Mit Hilfe der *ci*-Positionseffektmethode wurde nun die Wirkung verschiedener Strahlenintensitäten geprüft. Die ersten Versuchsserien wurden mit zwei verschiedenen Apparaten durchgeführt, der eine lieferte die Dosis von 6000 r innerhalb 13,8 Min., der andere dieselbe Dosis innerhalb 14 Stunden, wobei hier noch nach halber Bestrahlungszeit eine Pause von 41 Stunden dazwischen geschaltet wurde. Das Ergebnis war sehr auffallend, denn es ergab sich bei der verdünnt-fraktionierten Bestrahlung eine fast doppelte Mutationsrate im Vergleich zu der bei konzentrierter Behandlung. Dieser Befund mußte daher durch weitere Versuche einwandfrei gesichert werden. Für die nächsten Experimente wurden Grenzstrahlen benutzt und für alle Versuche derselbe Apparat verwandt. Die Intensität wurde durch Änderung



der Stromstärke und des Abstandes variiert. Die Bestimmung der Halbwertschicht bei verschiedenem Abstand ergab, daß durch die Luftfilterung die Qualität der Strahlen nicht geändert wurde. So erhielt man einwandfreie Vorbedingungen. Es wurden folgende Bestrahlungszeiten gewählt: 22,7 Min., 2 Stunden 26 Min., 4 Stunden 54 Min., 9 Stunden 45 Min. und 21 Stunden 30 Min. Die Ergebnisse sind mit den vorigen in Tabelle 5 zusammengestellt und in Abb. 7 graphisch dargestellt. Es wurde also auch bei diesen Versuchen zunächst mit Verdünnung der Strahlen eine höhere Mutationsrate erzielt. Der Wendepunkt zu einer Verminderung des Bestrahlungseffektes mit weiterer Verdünnung muß einmal auftreten, es ist jedoch ungewiß, ob tatsächlich bei einer Bestrahlungszeit von ungefähr 10 Stunden die für 6000 r höchste Mutationsrate auftritt, da gerade bei diesen Versuchen das erhaltene Material gering war. Eine Erklärungsmöglichkeit für dieses auffallende Ergebnis wird in der Diskussion erörtert werden.

Es muß noch festgestellt werden, daß die von KHVOSTOVA und GAVRILOVA erhaltenen Zahlen nun gut mit unseren übereinstimmen, denn diese beiden Autoren benutzten starke Strahlenkonzentration.

#### 4. Diskussion.

Die oben beschriebenen Versuche haben folgendes ergeben: Benutzt man eine Methode der Feststellung von Translokationen, die es ermöglicht, nur einen von den mindestens zwei Brüchen besonders ins Auge zu fassen, so kann man an Hand von Dosis- und Wellenlängenversuchen gewisse Aussagen über den physikalischen Primäreffekt, der zu einem Chromosomenbruch führt, machen. Unsere Versuche haben eine direkte Dosisproportionalität und Wellenlängenunabhängigkeit im Bereich der Röntgenstrahlen ergeben; daraus kann der Schluß gezogen werden, daß eine gewisse Ähnlichkeit zwischen den Entstehungsmechanismen einer Punktmutation und eines Chromosomenbruches besteht.

Betrachtet man an Hand der Abb. 8<sup>1</sup> die Lage der einzelnen Punkte und die Gerade, deren Neigung aus den Zahlen aller Versuche berechnet wurde, so ist eventuell eine geringe Krümmungstendenz im Sinne einer beginnenden S-förmigen Kurve festzustellen, zumal gerade die Mutationsraten der niederen Dosen stärker unter die Gerade fallen. Diese Erscheinung kann durch zwei Überlegungen erklärt werden: 1. Es könnte angenommen werden, daß bei geringeren Dosen eine wesentliche Abweichung der Wahrscheinlichkeit des zur Verfügung stehenden zweiten Bruches von 1 eintritt (s. die in der Methodik entwickelten Vorstellungen

<sup>1</sup> In dieser Abbildung sind sämtliche Ergebnisse der Versuche aus dieser Arbeit und den beiden vorher zitierten Arbeiten von KHVOSTOVA und GAVRILOVA zusammengestellt. Die Translokationsprozentsätze der Arbeiten von KHVOSTOVA und GAVRILOVA wurden auf dieselbe Rate pro Doseinheit wie die unseren rechnerisch gebracht.

über das Zustandekommen von *ci*-Translokationen); dadurch würde der Beginn der Dosisproportionalitätskurve eine gewisse Tendenz zur S-förmigkeit aufweisen. 2. Es könnte diese Tendenz durch eine gehemmte Rekombinationsmöglichkeit der Fragmente bedingt sein, die auf Grund der Untersuchungen von BAUER, DEMEREC und KAUFMANN (1938) als gegeben zu betrachten ist (s. Einleitung); können sich nämlich die Chromosomenfragmente nicht vollkommen frei kombinieren, so bleibt dann

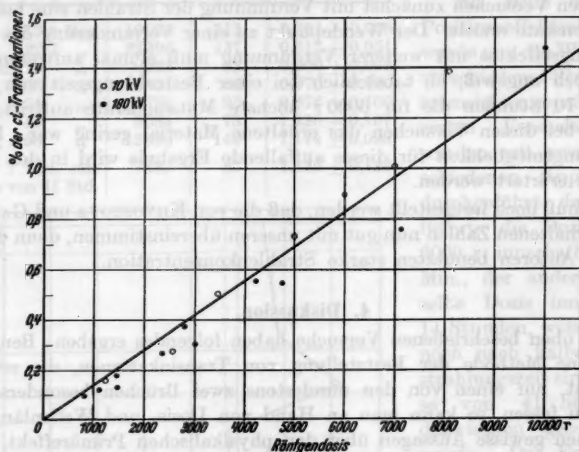


Abb. 8. Direkte Proportionalität der Raten von *ci*-Translokationen zu den Röntgenbestrahlungsdosen und Vergleich der mutationsauslösenden Wirkung von Grenzstrahlen und mittelharten Röntgenstrahlen bei *Drosophila melanogaster*. Zusammengestellt nach Versuchsergebnissen aus der vorliegenden Arbeit und nach den Resultaten von KHVOSTOVA und GAVRILOVA.

die Wahrscheinlichkeit des häufigen Bruches, der sich mit einem seltenerem *ci*-Bruch vereinigt, unter 1, was sich in der oben festgestellten Form der Kurve auswirken muß. Die gehemmte freie Kombinationsmöglichkeit der Fragmente muß weiterhin für die Deutung der Versuchsergebnisse herangezogen werden, die mittels der Koppelungsmethode reziproke Translokationen bei verschiedenen hohen Röntgendosen quantitativ erfaßt haben. Durch diese Methode werden stets zwei unabhängige Brüche gleicher Wahrscheinlichkeit erfaßt; es müßte sich daher mit zunehmender Dosis aus den einzelnen Mutationsraten eine Exponentialkurve mit dem Exponenten 2 ergeben, da ja die Häufigkeit des Sekundärereignisses durch das Produkt aus den Häufigkeiten der beiden voneinander unabhängigen Primärereignisse bestimmt wird. Aus den Versuchsergebnissen von BELGOVSKY (1938) und KHVOSTOVA und GAVRILOVA (1938) ist zu ersehen, daß der Anstieg der gefundenen Kurve

wesentlich geringer ist, als sie nach obiger theoretischer Überlegung und bei freier Rekombinationsmöglichkeit zu erwarten wäre. Ist diese aber gehemmt, so muß sich eine Exponentialkurve ergeben, deren Exponent zwischen 1 und 2 liegt.

Unsere Feststellung, daß das Zustandekommen eines Bruches eine direkte Dosisproportionalität aufweist, wird wesentlich durch die Ergebnisse unveröffentlichter Versuche von BAUER gestützt. Die in diesen Versuchen benutzte Methode kann kurz folgendermaßen dargestellt werden: Es werden *Drosophila*-Männchen bestrahlt, die ein ringförmiges X<sup>c</sup>-Chromosom besitzen, und diese dann mit normalen Weibchen gekreuzt. Geht dieses Ringchromosom eine reziproke Translokation mit einem Autosom ein, so führt diese Aberration zu einem dizentrischen, das Absterben der Zygote bedingendem Chromosom, was bei Translokationen mit normalen X-Chromosomen nur in einem Teil der Fälle vorkommt. Bei intrachromosomaler Translokation zwischen den Spalthälften der X<sup>c</sup>-Chromosomen entstehen Doppelringchromosomen, die entweder eliminiert werden oder zygotenletal sind. Durch diese Bildung von letal wirkenden Aberrationen wird das Geschlechtsverhältnis zugunsten der Männchen wesentlich verschoben; es läßt sich somit durch die Feststellung des Ausfalles der Weibchen eine bestimmte Gruppe von Chromosomenaberrationen quantitativ erfassen. Entsprechend durchgeführte Dosisversuche haben zu dem Ergebnis geführt, daß ein Treffer notwendig ist, einen Chromosomenbruch auszulösen.

Überblickt man alle Versuchsergebnisse über das Verhältnis der Mutationsrate zur Strahlendosis mit den Werten, die sich bei den Versuchen mit Strahlung anderer Wellenlänge ergaben, so kommt man zu dem unzweideutigen Schluß, daß ein Treffer in Form einer *Ionisation* die Auslösung eines Chromosomenbruches bewirken kann. Das Primäreignis ist somit ähnlich oder gleich dem, das eine Genutation zu erzeugen vermag. Die aufgetretenen geringen Abweichungen in den Versuchsergebnissen können auf eine gehemmte Rekombinationsmöglichkeit der Fragmente zurückgeführt werden.

Aus den Versuchen mit verschieden konzentrierter Bestrahlung ergab sich ein Zeitfaktor, der kleiner als 1 ist. Dieses Ergebnis steht zunächst in Widerspruch zu den Zeitfaktorversuchen, die SAX (1939) an Chromosomen der Mikrosporen von *Tradescantia* durchgeführt hat. SAX erhielt einen Zeitfaktor, der größer als 1 ist, und deutete das Ergebnis dahingehend, daß die Chromosomenfragmente nur eine bestimmte Verweilzeit haben, innerhalb welcher eine Verbindung mit einem anderen Fragment eingegangen werden kann, und daß dadurch mit fortschreitender Strahlenverdünnung die Verbindungsmöglichkeiten zweier Fragmente sich immer ungünstiger gestalten, da die Brüche zeitlich zu sehr auseinander liegen und daher vorher bereits eine Wiedervereinigung der ursprünglichen Fragmente erzielt werden kann. Von dieser Hypothese

ausgehend läßt sich auch unser Ergebnis deuten, wenn man eine längere Verweilzeit der Fragmente des IV. Chromosoms (unser „erster“ Bruch) im Vergleich zu der des „zweiten“ Bruches (also dem Mittelwert der Verweilzeit aller anderen Fragmente) annimmt. Es würden dann die im Verlauf einer kurzen Bestrahlungszeit entstehenden Fragmente der anderen Chromosomen (X, II, III) wegen ihrer zu kurzen Verweilzeit gar nicht alle Möglichkeiten voll ausnützen können, sich mit einem Fragment des IV. Chromosoms zu verbinden. Bei längerer Bestrahlungszeit aber wären Fragmente des IV. Chromosoms wegen ihrer längeren Verweilzeit sozusagen aufgestapelt, so daß diese dann mit neuentstehenden Brüchen an anderen Chromosomen Anlaß zu häufigeren Translokationen geben würden.

Neben dieser Erklärungsmöglichkeit läßt sich noch eine andere aufbauen, die außer einer bestimmten Verweilzeit der Fragmente und der Bestrahlungszeit eine „Neuordnungszeit“ als bestimmenden Faktor mit heranzieht, der bei einem bestimmten Verhältnis zu den anderen zwei Zeiten bis zu einem gewissen Grad der Verdünnung einen größeren Bestrahlungseffekt hervorrufen kann. Unter „Neuordnungszeit“ wird hierbei diejenige Zeit verstanden, welche notwendig ist, durch chromosomale Bewegungen neue Berührungspunkte und Kombinationsmöglichkeiten den Fragmenten zu bieten. Nimmt man z. B. eine Verweilzeit von einer Stunde, eine Neuordnungszeit von zwei Stunden an und setzt für den einen Fall eine Bestrahlungszeit von einer Stunde, für den anderen eine solche von zwei Stunden, so muß sich im zweiten Fall eine höhere Mutationsrate ergeben als im ersten. Es wird sich nämlich dann die gleiche Größe der Bestrahlungszeit und der Neuordnungszeit für das Zustandekommen von Translokationen günstig auswirken, denn andererseits liegen bei einer kürzeren Bestrahlungszeit die Chromosomenbrüche zeitlich zu sehr beieinander, so daß sich die Neuordnungszeit nicht mehr positiv auswirken kann. Mit einer weiteren Verlängerung der Bestrahlungszeit muß dann natürlich wieder ein geringerer Effekt auftreten, da durch die begrenzte Verweilzeit die Bruchstellen vorzeitig inaktiv werden, bevor sie sich mit anderen Brüchen kombinieren können.

Alle unsere Versuchsergebnisse, sowie auch diejenigen anderer Autoren über das Verhältnis der Mutationsrate zur Strahlendosis und zur Intensität der Bestrahlung sprechen für die Bruchhypothese. Namentlich der cytologische Nachweis freier Chromosomenfragmente und das Auftreten eines Zeitfaktors legen den Schluß nahe, daß als erste grobe Strukturänderung Chromosomenbrüche stattfinden und daß die dadurch entstandenen Fragmente sich erst sekundär zu Translokationen verbinden. Die Gegensätzlichkeit unseres festgestellten Zeitfaktors zu dem von SAX gefundenen kann entweder durch einen ungleichen Mittelwert der Verweilzeit verschiedener Chromosomenfragmente, oder durch ein bestimmtes, sich bis zu einem gewissen Grad der Strahlenverdünnung hin

positiv auswirkendes Verhältnis zwischen Bestrahlungszeit, Verweilzeit und Neuordnungszeit erklärt werden.

Ein Ausbau der vorliegenden Untersuchungen kann durch die Lösung folgender Fragen erzielt werden: Mit Hilfe von Neutronenstrahlung, die ebenfalls quantitativ in „r“ gemessen werden kann, wären Dosisversuche durchzuführen. Das Ergebnis wäre von gewisser theoretischer Bedeutung, denn einerseits wird man bei einer Verminderung der Mutationsrate und aus der Größe des verringerten Effektes auf die relative Dimension des Treffbereiches bei Chromosomenmutationen im Vergleich zu dem bei Genmutationen schließen können; andererseits aber würde ein sich ergebender Unterschied in der Größe des Treffbereiches die Frage im verneinenden Sinne lösen, ob Gen- und Chromosomenmutationen ihrem Wesen nach dasselbe sind. TIMOFEEFF-RESSOVSKY und ZIMMER (1938) haben mit Neutronenstrahlen Auslösungsversuche von Genmutationen durchgeführt. Der Effekt gleicher in „r“ gemessener Mengen von Neutronenstrahlen blieb beträchtlich hinter dem bei Röntgenstrahlen zurück, was auf die besondere Dichte der Ionisationen bei Neutronen und auf die Größe des Treffbereichs zurückzuführen ist.

Gewisse Hinweise liegen dafür vor, daß Chromosomenmutationen durch Ultraviolettbestrahlung im Vergleich zu Punktmutationen in relativ geringerem Maße erzeugt werden (MULLER und MACKENZIE, 1939). Diese Feststellung muß in quantitativer Richtung nachgeprüft werden; denn daraus könnte der Schluß gezogen werden, daß für viele oder alle Chromosomenbrüche die Aktivierungsenergie höher als bei der Entstehung einer Punktmutation sein muß. Darauf könnte auch die für *Drosophila* mit genügender Sicherheit festgestellte Tatsache beruhen, daß Chromosomenmutationen im spontanen Mutationsprozeß eine relativ geringere Rolle als in dem durch Röntgenstrahlen ausgelösten spielen.

Schließlich können weiter ausgebaut Zeitfaktorversuche für die Überprüfung der dargelegten Vorstellungen herangezogen werden. Es müßte einerseits mit noch weiterer Strahlenverdünnung gearbeitet werden, andererseits würde man zweckmäßig mit fraktionierter Bestrahlung zur endgültigen Lösung der Frage Beiträge liefern können. Zeitfaktorversuche, deren Effekt mittels der Koppelungsmethode analysiert wird, könnten die Frage lösen, ob eine längere Verweilzeit der Fragmente des IV. Chromosoms, oder eine Mitwirkung der Neuordnungszeit eine Steigerung der Mutationsrate mit Verdünnung der Strahlung bewirken kann. Dieselbe Frage könnte auch durch Anwendung anderer Positionseffektmethoden angegriffen werden, die eine quantitative Erfassung von Chromosomenbrüchen an anderen bestimmten Stellen des Genoms gestatten.

Zunächst ergibt sich somit folgende vorläufige Vorstellung über den Mechanismus von Chromosomenmutationen: Ein Primäreignis, das

mit dem zu Punktmutationen führenden vergleichbar ist, veranlaßt die Bildung einzelner Chromosomenbrüche, die sich nachher neu kombinieren können. Bei der Rekombination von durch Brüche entstandenen Chromosomenfragmenten spielt aber einerseits die beschränkte Verweilzeit der freien Bruchenden und andererseits die räumliche Anordnung der Chromosomen eine gewisse Rolle. Dadurch erklären sich einerseits die Abweichungen von den bei zwei Brüchen auf Grund zufälliger, freier Kombination zu erwartenden Dosisproportionalitätskurven und andererseits das Auftreten eines ausgesprochenen Zeitfaktoreffektes in den Bestrahlungsversuchen. Den Primärmechanismus eines Chromosomenbruches kann man vorläufig mit dem Mechanismus einer Punktmutation vergleichen unter der Annahme, daß er Bindungen in der Längsstruktur eines Chromosoms löst, wobei die benachbarten Gene unversehrt bleiben können. Vielleicht ist für die Lösung dieser Bindungen eine größere Aktivierungsenergie notwendig als für Änderungen und Umgruppierungen innerhalb der „genischen“ Atomverbände. Es muß aber betont werden, daß diese Vorstellungen zunächst lediglich als Arbeitshypothese anzusehen sind.

#### Zusammenfassung.

1. In der vorliegenden Arbeit werden Versuche zur Auslösung von Translokationen mittels Röntgenstrahlen verschiedener Dosen, verschiedener Härte und Intensität durchgeführt.
2. Es wurde die *ci*-Positionseffektmethode angewandt, die es ermöglicht, besonders einen der beiden bei jeder Translokation beteiligten Chromosomenbrüche ins Auge zu fassen.
3. Versuche mit harten Röntgenstrahlen ergaben eine direkte Proportionalität der Rate ausgelöster *ci*-Translokationen zu den Bestrahlungsdosen, woraus geschlossen werden kann, daß ein Chromosomenbruch durch *einen* Treffer erzeugt wird.
4. Versuche mit verschiedenen Wellenlängen (harte Röntgenstrahlen und Grenzstrahlen) ergaben eine klare Wellenlängenunabhängigkeit. Es wird daraus geschlossen, daß ein Treffer eine *Ionisation* darstellt.
5. Aus Zeitfaktorversuchen (Applikation gleicher Gesamtdosen in verschiedener Expositionsdauer) wurde festgestellt, daß eine Verdünnung der Dosis bis zu einem gewissen Grade die erzeugte Translokationsrate steigert.
6. In der Diskussion werden Erklärungen für die Ergebnisse der Zeitfaktorversuche gegeben und eine vorläufige Vorstellung über den Entstehungsmechanismus von Chromosomenmutationen entwickelt.

#### Literaturverzeichnis.

- Bauer, H.: Die Chromosomenmutationen. Z. Abstammungslehre 76 (1939). —  
Bauer, H., M. Demeree and B. P. Kaufmann: X-ray induced chromosomal alterations



in *Drosophila melanogaster*. Genetics 23 (1938). — Bauer, H. u. R. Weschenfelder: Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses in der  $F_1$  nach Röntgenbestrahlung von *Drosophila*. Naturwiss. 26 (1938). — Belgovsky, M.: Dependence of translocation frequency in *Drosophila melanogaster* upon the X-ray dosage. Biol. Žurn. 6 (1937). — Dubinin, N. P. and B. Sidorov: Relation between the effect of the gene and its position in the system. Biol. Žurn. 3 (1934). — Dubinin, N. P., N. N. Sokolov and G. G. Tiniakov: A cytogenetic study of the position effect. Biol. Žurn. 4 (1935). Khvostova, V. B.: Detection of translocations in the proximal region of the X-chromosome of *Drosophila melanogaster* by means of the method of position effect. Biol. Žurn. 5 (1936). — Khvostova, V. B. and A. Gavrilova: A new method for discovering translocations. Biol. Žurn. 4 (1935). — Relations between the number of translocations in *Drosophila melanogaster* and the X-ray dosage. Biol. Žurn. 7 (1938). Muller, H. J. and K. Mackenzie: Discriminatory effect of ultraviolet rays on mutation in *Drosophila*. Nature (Lond.) 143 (1939). — Sax, K.: Chromosome aberrations induced by X-rays. Genetics 23 (1938). — The time-factor in X-ray production of chromosome aberrations. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 25 (1939). — Serebrovsky, A. S.: A general scheme for the origin of mutations. Amer. Naturalist 63 (1929). — Stadler, L. J.: On the genetic nature of induced mutations in plants. Proc. 6. internat. Congr. Genet. 1 (1932). — Timoféeff-Ressovsky, N. W.: Le Mécanisme des mutations et la structure du gène. Paris: Hermann 1939. — Timoféeff-Ressovsky, N. W. u. K. G. Zimmer: Strahlengenetische Zeitfaktorversuche an *Drosophila melanogaster*. Strahlenther. 53 (1935). — Wellenlängenunabhängigkeit der mutationsauslösenden Wirkung der Röntgen- und Gammastrahlen bei *Drosophila melanogaster*. Strahlenther. 54 (1935). — Neutronenbestrahlungsversuche zur Mutationsauslösung an *Drosophila melanogaster*. Naturwiss. 26 (1938). — Mutationsauslösung durch Röntgenbestrahlung unter verschiedener Temperatur bei *Drosophila melanogaster*. Biol. Zbl. 59, H. 7/8 (1939). — Timoféeff-Ressovsky, N. W., K. G. Zimmer u. M. Delbrück: Über die Natur der Genmutation und der Genstruktur. Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl., Fachgr. 6, N.F. 1, Nr 13 (1935).

(Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie, Abteilung M. HARTMANN.  
Berlin-Dahlem.)

## DIE ANORDNUNG DER CHROMOSOMEN IM SPERMIENKERN VON DICRANOMYIA TRINOTATA MEIG.

Von

ERICH WOLF.

Mit 3 Textabbildungen (19 Einzelbildern).

(Eingegangen am 21. Oktober 1939.)

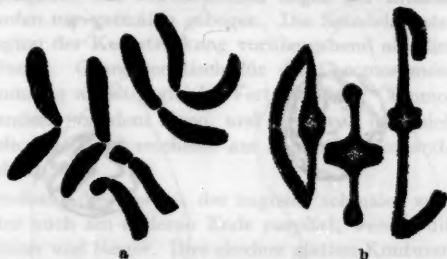
Für Untersuchungen über die Auslösung von Chromosomenmutationen gewinnt die Frage nach der Chromosomenanordnung im Ruhekern in der speziellen Form des Spermakopfes deshalb Bedeutung, weil gerade die männlichen Keimzellen am häufigsten als Bestrahlungsobjekte herangezogen werden. Da im allgemeinen bei der Spermiendifferenzierung nach der Telophase der zweiten Reifeteilung sich der Spermatidenkern verdichtet und bald homogen erscheint, läßt sich hinsichtlich der Lage der Chromosomen im Spermienkopf meistens keine Aussage machen. Eine Ausnahme liegt nur bei den Nematoden vor, wo die punktförmigen Chromosomen noch im reifen Spermium getrennt sichtbar und zählbar sind (z. B. Mulsow 1911 für *Ancyracanthus cystidicola*). Diese Erscheinung kommt dadurch zustande, daß die Chromosomen kompakt bleiben und erst nach dem Eindringen des Spermiums ins Ei Veränderungen unterworfen sind. Da es sich hier aber um schwanzlose, starr amöboide, also abnorme Spermientypen handelt, scheidet dieser Sonderfall hierfür aus.

Eine neue Ausnahme stellt *Dicranomyia trinotata* dar. Bei der Untersuchung der Spermatogenese dieses Dipters wies mich Herr Dr. BAUER, dem ich auch einen großen Teil der verwendeten Präparate verdanke, auf die Eignung dieser Art hin, der gestellten Frage nachzugehen. Die Chromosomen von *Dicranomyia* sind während einer langen Zeit im Spermatidenkern zu sehen und hinsichtlich ihrer gegenseitigen Anordnung zu verfolgen, ehe die Homogenisierung des Kernes erfolgt.

Von vornherein sind hinsichtlich der Lage der Chromosomen zwei Möglichkeiten in Betracht zu ziehen: 1. Die Polfeldanordnung der telophasischen Chromosomen bleibt bei der Bildung des Spermienuhekernes erhalten; 2 die Polfeldanordnung verschwindet zugunsten einer zufälligen Verteilung der Chromosomen im Kernraum. Beide Arten der Anordnung sind aus normalen Ruhekernen bekannt. RABL beschrieb 1885 einen typischen Fall von Polfeldanordnung an den Epidermiszellen von *Salamandra maculata*. Hier gehen die Chromosomen in der gleichen charakteristischen Stellung aus dem Kern hervor, die die Tochterchromosomen beim Übergang in den Ruhekern einnehmen. I. MANTON (1935) stellte

diesem Ruhekerntyp einen durch *Biscutella* und *Iberis* charakterisierten Typ gegenüber. Die Chromosomen verlassen hier ihre Polfeldanordnung während der Ruhekernbildung und verteilen sich gleichmäßig über die Peripherie des Kernraumes. Während sich der Nichtpolfeldtyp besonders darin auszeichnet, daß die Kernsaftmenge relativ groß und die Masse der meist kleinen Chromosomen verhältnismäßig gering ist, sind beim Polfeldtyp große, lange, in ihrer Bewegung sich gegenseitig hemmende Chromosomen vorhanden. Danach ist für die an *Dicranomyia* tr. durchgeführten Untersuchungen eine Polfeldanordnung der Chromosomen zu erwarten, da bei dieser Art große Chromosomen vorhanden sind.

Zur Verwendung kamen Quetsch-Dauerpräparate von mit Karmin-Essigsäure gefärbten Hoden älterer Larven. Zum größten Teil wurden die Präparate nachträglich abmontiert, mit Bouin-Allen fixiert und nach FEULGEN oder HEIDENHAIN gefärbt. Außerdem wurden zum Vergleich Schnittpräparate angefertigt. Das Larvenmaterial, das aus dem Plöner See stammt, verdanke ich der Liebenswürdigkeit von Herrn Prof. THIENEMANN.



Eine Übersicht über den Chromosomenbestand von *Dicranomyia*

gibt die Abb. 1a von einer Äquatorialplatte einer Spermatogonie. Abb. 1b zeigt ein typisches Metaphasestadium der 1. Reifeteilung. Es sind drei Chromosomenpaare vorhanden, deren Homologe in der Mitose in der für Dipteren charakteristischen Weise nebeneinander liegen. 2 Paare der Chromosomen sind in der Größe nicht unterscheidbar; sie sind V-förmig mit nahezu medianer Spindelansatzstelle. Das dritte Paar ist kleiner und ungleichschenkelig; die Längen der Arme verhalten sich etwa wie 1 : 3. Die Partner aller drei Chromosomenpaare sind einander gleich in Größe und Gestalt, auch strukturelle Unterschiede (Heterochromatin) sind in Prophasen nicht nachweisbar. Es sind also keine Heterochromosomen vorhanden<sup>1</sup>.

Den Ablauf der Veränderungen des Spermatidenkernes gibt die Abb. 2 wieder. In der Telophase der zweiten Reifeteilung erreichen die Chromosomen das Maximum der Kontraktion unter Beibehaltung ihrer Polfeldanordnung (Abb. 2a). Dann verklumpen sie völlig und bilden einen in der letzten Teilungsrichtung eiförmig gestreckten Kern, in dem sich Kernsaft ansammelt (Abb. 2b). Die Chromosomen erfahren sodann eine

<sup>1</sup> Die genaue Darstellung der Mitose wird in einer späteren Arbeit gegeben werden.

Abb. 1a und b. a Metaphase einer Spermatogonie in Polansicht. b Metaphase einer Spermatocyte I in Seitenansicht. Karmin-Essigsäure. Vergr. 4100mal.

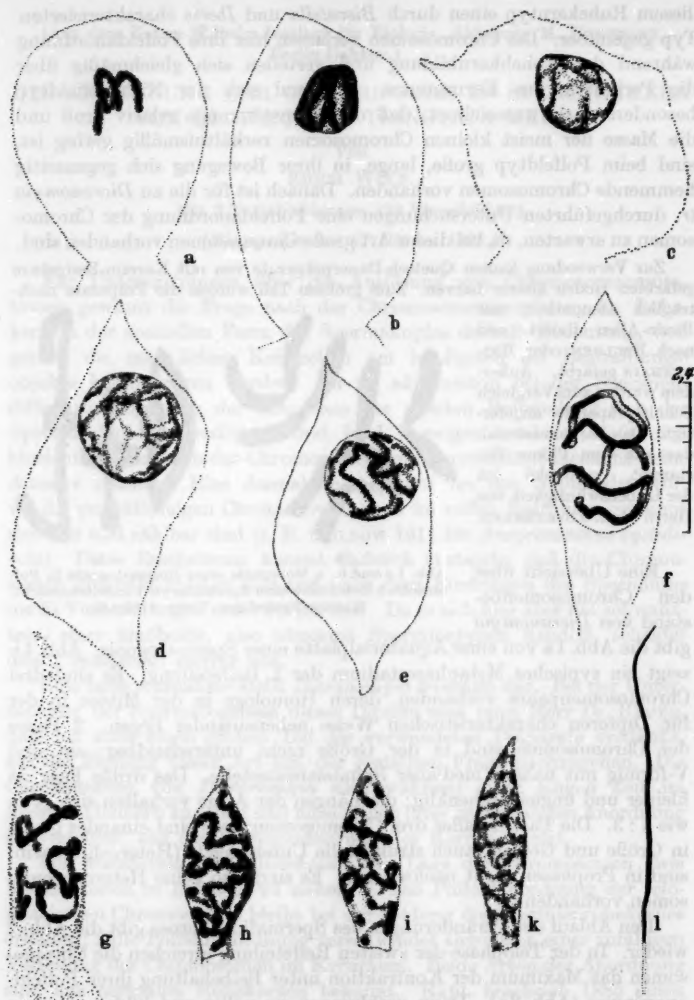


Abb. 2a—l. Kernentwicklung in der Spermatohistogenese. a Späte Anaphase II. b Telophase. c + d Der Telophase II folgende, ruhekernartige Stadien. e + f Spermatidenkerne, in denen die Chromosomen wieder sichtbar werden. Bei f typische Anordnung der Chromosomen in einem medianen Polfeld. g + l Weiterentwicklung des Spermatidenkernes zum fertigen Spermakopf. a—l BOVIN-ALLEN, FEULGEN — Lichtgrün. k Karmin-Essigsäure. l BOVIN-ALLEN, FEULGEN. Vergr. 4100mal.

Auflockerung, sie werden dünn und verteilen sich als unregelmäßige, feine Fäden an der Peripherie des von einer Membran umschlossenen Kernes (Abb. 2c). Dieser wird kugelförmig und sein Volumen nimmt stark zu. Die Chromosomen sind für einige Zeit nur noch als feine und netzige Strukturen im Kern zu erkennen (Abb. 2d). Nach dieser ruhekernartigen Phase verkürzen und verdicken sich die Chromosomenfäden, bis sie wieder einzeln erkennbar werden. Ihre periphere Lage behalten sie bei (Abb. 2e). Der Kern streckt sich und nimmt tonnenförmige oder ellipsoide Gestalt an (Abb. 2f). Aus der Häufigkeit der in diesem Stadium befindlichen Zellen kann geschlossen werden, daß diese längere Zeit in ihm verharren. Dieses Stadium ist für die vergleichende Untersuchung der Chromosomenanordnung besonders geeignet. Die Chromosomen liegen der inneren Kernwand an und verlaufen unregelmäßig gebogen. Die Spindelansatzstellen treten nur zu Beginn der Kernstreckung vorübergehend als Einschnürungen in Erscheinung. Charakteristisch für die Chromosomenlagerung ist eine massenmäßig allseitig gleiche Verteilung der Chromosomen. Das Plasma wandert von dem einen, und zwar von dem sich zuerst zuspitzenden Ende, weg und erscheint am stumpfen Kernende als schwanzförmiger Anhang.

Mit der weiteren Streckung des Kernes, der zugleich schmaler wird und sich an einem, später auch am anderen Ende zuspitzt, werden die Chromosomen wieder dünner und länger. Ihre ehemals glatten Konturen verschwinden, indem an ihnen verschmälerte Abschnitte und Einschnürungen auftreten (Abb. 2g). Die mäanderartig sich verlängernden Schlingen der Chromosomen breiten sich gleichmäßig über die innere Kernmembran aus (Abb. 2h und i). Das Kernvolumen nimmt in der letzten Streckungsphase stark ab. Die Abgabe von Kernsaft erfolgt meist nicht gleichmäßig an allen Teilen der Kernmembran, sondern vorzugsweise an den Enden des Kernes. Dadurch erhält der Spermienkern kurz vor der maximalen Streckung eine lanzett- oder leicht sichelförmige Gestalt (Abb. 2k). Der Kern läßt bald keine Struktur mehr in seinem Inneren erkennen und erscheint völlig homogen. Der fertige Spermienkopf ist ein nach den Enden hin sich verschmälernder Faden von etwa der doppelten Länge des zur Analyse der Chromosomenlagerung dienenden Stadiums (Abb. 2l). Diejenige Spitze, die sich bei der Kernstreckung zuerst anlegte, ist am fertigen Spermienkern noch von dem hinteren leicht stumpfen Ende zu unterscheiden, dem der lange Schwanzfaden ansitzt. Vom Beginn der Anaphase II bis zum Homogenwerden des Spermienkopfes ist niemals an den Chromosomen ein Längspalt zu beobachten.

Das mittlere Stadium der Spermatidenkernentwicklung gibt die Möglichkeit hinsichtlich der Lagebeziehungen der Chromosomen quantitative

Feststellungen zu machen. Die Spindelansatzstellen sind hier zwar gewöhnlich nicht erkennbar; da sie aber bei den beiden großen Chromosomen nahezu median gelegen sind, läßt sich ihre Lage in den Zeichnungen mit ziemlicher Genauigkeit durch Markierung der Chromosomenmitten bestimmen. Allerdings sinkt der Genauigkeitsgrad etwas durch die Verkürzung der in der optischen Achse liegenden Chromosomenstrecken, die aber weitgehend berücksichtigt worden ist. Das kleine ungleichschenklige Chromosom kann zur Lagebestimmung nicht herangezogen werden. Zur Analyse wird jeder Kern in der Richtung seiner größten Ausdehnung in 5 gleichbreite Querabschnitte (1—5) unterteilt.

Tabelle 1.

Lagetypen	Häufigkeiten
1,1 (= 5,5)	2
1,2 (= 2,1, 4,5, 5,4)	4
1,3 (= 3,1, 3,5, 5,3)	4
1,4 (= 4,1, 2,5, 5,2)	4
1,5 (= 5,1)	2
2,2 (= 4,4)	2
2,3 (= 3,2, 3,4, 4,3)	4
2,4 (= 4,2)	2
3,3	1

Es wird dann festgestellt, in welchem der 5 Kernabschnitte die Mitten der 2 großen Chromosomen liegen. Nach dem Schachbrettschema ergeben sich bei zufallsgemäßer Verteilung 25 Lagemöglichkeiten. Da die Enden der betreffenden Spermatidenkerne aber gewöhnlich nicht voneinander unterscheidbar sind und daher die Bezeichnung 1,1 (beide Chromosomen mitten im Endabschnitt 1) die gleichen Verhältnisse wiedergibt wie 5,5, ebenso 1,2 dieselben wie 2,1, 4,5 und 5,4 usw., bleiben 9 Typen und ihre aus Tabelle 1 ersichtlichen Häufigkeiten.

Alle diese Lagemöglichkeiten außer 1,1 und 1,5 sind in der Abb. 3 und (2,4) Abb. 2f wiedergegeben. In der angegebenen Art wurden die Zeichnungen von 60 Kernen ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2.

Lagetypus	1,1	1,2	2,2	1,3	1,4	1,5	2,3	2,4	3,3
Beobachtet n = 60	0	1	2	5	8	1	27	14	2
	3			14			43		
Erwartet . . . .	4,8	9,6	4,8	9,6	9,6	4,8	9,6	4,8	2,4
	19,2			24,0			16,8		

Schon der bloße Augenschein zeigt, daß keine Zufallsverteilung der Chromosomen vorliegt, denn die zahlenmäßigen Abweichungen der 9 Klassen vom erwarteten Wert sind erheblich. Die Wahrscheinlichkeit, daß das Material eine Zufallsverteilung repräsentiert, ist kleiner als  $1 \cdot 10^{-9}$ . Es muß also eine bestimmte Anordnung, ein Polfeld, vorliegen, das 1. terminal, 2. median oder 3. wechselnd orientiert sein könnte. Bei einer terminalen Lage des Polfeldes sollten die Klassen 1,1, 1,2, 2,2 vorherrschen.



Von ihnen wurden aber insgesamt nur 3 Fälle unter den 60 Kernen beobachtet, während schon bei Zufallsverteilung 19,2 zu erwarten gewesen wären. Dagegen steht den mit der Häufigkeit von 16,8 bei Zufallsanordnung erwarteten Fällen eines medianen Polfeldes, das den Lagetypen 3,3, 2,3 und 2,4 entspricht, 43 beobachtete Fälle gegenüber. Hieraus geht noch deutlicher hervor, daß keine Zufallsverteilung besteht. Ferner besagt der augenfällige Unterschied zwischen den Häufigkeiten der Klassen für terminales und denen für medianes Polfeld, daß keine variable, sondern eine fast ausschließlich mediane Lage des Polfeldes vorliegt. Die Benachteiligung der Kernabschnitte 1 und 2 wegen der Tonnenform ist gering und kann, ebenso wenig wie der nicht sehr hohe Genauigkeitsgrad der Bestimmung der Chromosomenmitten, nicht diese starken quantitativen Verschiedenheiten erklären. Die Häufigkeit der Nichtpolfeld-Klassen (Typen 1,3, 1,4 und 1,5) ist beträchtlich genug, um den Schluß zu erlauben, daß in einem Teil der Kerne die Polfeldanordnung durch Abwandern der Spindelansatzstellen aus dem Polfeld nachträglich verloren gegangen ist. Die vergleichend cytologische Analyse legt die Vermutung nahe, daß diese Gruppe ein älteres Stadium in der Spermienkernentwicklung darstellt. Daß das kleine ungleichschenklige Chromosom sich in gleicher typischer Weise in das Polfeld einpaßt, geht aus den Abb. 2f, 3a und 3f deutlich hervor.

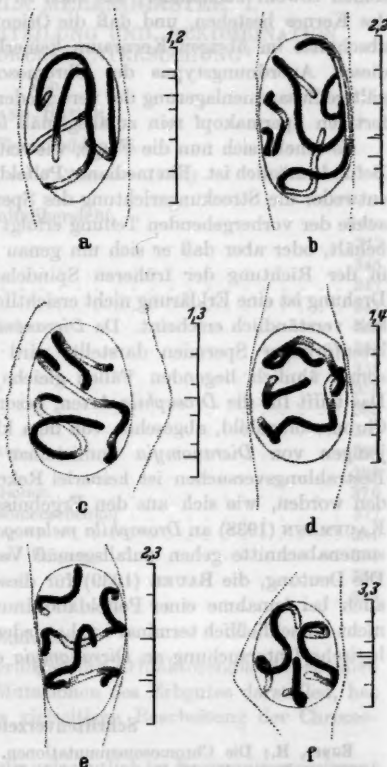


Abb. 3a-f. Spermakidkerne im mittleren Stadium der Spermindifferenzierung. Maßstäbe mit Markierung zur Lagefeststellung der Mitten der großen Chromosomen. Sämtliche Präparate nach FEULGEN und, außer e, alle mit Lichtgrün nachgefärbt. Vergr. 4100mal.

Damit ist nachgewiesen, daß die Chromosomen bei *Dicranomyia* vorwiegend in einem medianen Polfeld angeordnet sind. Da weiterhin innerhalb dieses Polfeldes keine bestimmten Lagebeziehungen der Chromosomen sowohl zueinander, als auch zu der künftigen Streckungsachse des Kernes bestehen, und daß die Orientierung der distalen Schenkelabschnitte im übrigen Kernraum keinerlei Konstanz zeigt, wird durch diesen Anordnungstypus der Chromosomen erreicht, daß die endgültige Zusammenlagerung der verschiedenen Chromosomenabschnitte im fertigen Spermakopf rein zufallsgemäß ist.

Es erhebt sich nun die Frage, wieweit eine Verallgemeinerung dieser Befunde möglich ist. Ein medianes Polfeld kann dadurch bedingt sein, daß entweder die Streckungsrichtung des Spermiums senkrecht zur Spindelachse der vorhergehenden Teilung erfolgt und der Kern seine Lage beibehält, oder aber daß er sich um genau  $90^\circ$  dreht, wenn die Streckung in der Richtung der früheren Spindelachse erfolgt. Für eine solche Drehung ist eine Erklärung nicht ersichtlich, während die andere Möglichkeit verständlich erscheint. Da *Dicranomyia* einen normalen Fall flagellatenförmiger Spermien darstellt, wird man mindestens bei chromosomal ähnlich liegenden Fällen gleiche Verhältnisse erwarten dürfen. Das trifft für die *Drosophila*-Arten, besonders *D. melanogaster* zu, deren Chromosomenbild, abgesehen von dem kleinen Chromosom 4, mit demjenigen von *Dicranomyia* unmittelbar verglichen werden kann. In Bestrahlungsversuchen ist keinerlei Rekombinationsbevorzugung gefunden worden, wie sich aus den Ergebnissen von BAUER, DEMEREC und KAUFMANN (1938) an *Drosophila melanogaster* ergeben hat. Alle Chromosomenabschnitte gehen zufallsgemäß Verlagerungen untereinander ein. Die Deutung, die BAUER (1939) für diese Befunde gab, wonach sie sich auch bei Annahme einer Polfeldanordnung erklären lassen, wenn diese nicht ausschließlich terminal ist, hat jedenfalls durch die direkte morphologische Untersuchung an *Dicranomyia* eine neue Stütze bekommen.

#### Schriftenverzeichnis.

- Bauer, H.: Die Chromosomenmutationen. Z. Abstammungslehre 76, 309—322 (1939). — Bauer, H., M. Demerec and B. P. Kaufmann: X-ray induced chromosomal alterations in *Drosophila melanogaster*. Genetics 23, 610—630 (1938). — Manton, L.: Some new evidence on the physical nature of plant nuclei from intraspecific polyploids. Proc. roy. Soc. Lond. B, 118, 522—547 (1935). — Mulsow, K.: Chromosomenverhältnisse bei *Ancyrananthus cystidicola*. Zool. Anz. 38, 448—486 (1911). — Rabl, C.: Über Zelltheilung. Gegenbauers Jb. 10, 214—330 (1885).

(Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie, Abt. M. HARTMANN, Berlin-Dahlem.)

## RÖNTGENAUSLÖSUNG VON CHROMOSOMENMUTATIONEN BEI DROSOPHILA MELANOGASTER. I.

### BRUCHHÄUFIGKEIT, VERTEILUNG UND REKOMBINATION NACH SPEICHELDRÜSENUNTERSUCHUNG<sup>1</sup>.

Von

HANS BAUER.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. November 1939.)

Inhaltsübersicht.	Seite
I. Einleitung . . . . .	343
II. Untersuchungsverfahren . . . . .	345
III. Die Dosisproportionalität . . . . .	347
1. Mutierte Spermien . . . . .	347
2. Die Kontaktpunkte und Brüche . . . . .	349
3. Besprechung . . . . .	355
IV. Die Bruchverteilung . . . . .	358
1. Die Lokalisation der Brüche . . . . .	358
2. Besprechung . . . . .	365
V. Die Bruchrekombination . . . . .	368
1. Der Abstand der Bruchpunkte . . . . .	369
a) Balancierte Mutationen . . . . .	369
b) Deficiencies und Duplikationen . . . . .	376
2. Die Beteiligung der Chromosomenschenkel . . . . .	377
3. Besprechung . . . . .	381
VI. Allgemeine Ergebnisse und offene Fragen . . . . .	384
Zusammenfassung . . . . .	388
Schriftenverzeichnis . . . . .	389

#### I. Einleitung.

Die Erkenntnis, daß die Änderungen der Erbfaktoren*anordnung* einen sehr umfangreichen Anteil der Mutationen des Erbgutes darstellen, hat in den letzten Jahren zu einer vielseitigen Bearbeitung der Chromosomenmutationen geführt.

Nachdem in der Zeit vor 1927 die gelegentlich im Kreuzungsexperiment erfaßten Chromosomenmutationen nur anzeigten, daß verschiedene Verlagerungen innerhalb eines Chromosoms oder zwischen den Chromosomen möglich sind, ist der Fortschritt der Analyse hauptsächlich zwei Entdeckungen zu verdanken: 1. Der von MULLER und STADLER gefundenen außerordentlich starken Erhöhung der Mutationsrate durch Röntgenstrahlen, und 2. der Aufdeckung der Natur der Speicheldrüsenchromosomen und ihrer Heranziehung zu cytogenetischen Untersuchungen.

<sup>1</sup> Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung durch den Reichsforschungsrat ausgeführt.

Bald nach der Feststellung, daß neben Punktmutationen auch Verlagerungen ausgelöst werden (MULLER und ALTENBURG, OLIVER), sind die beiden späterhin die Diskussionsgrundlage bildenden Hypothesen über den Mechanismus der Chromosomenmutationen veröffentlicht worden: SEREBROVSKY (1929) forderte einen Crossing-over-artigen Mechanismus, nach dem die Umordnung der Chromosomenabschnitte nur an solchen Orten vor sich gehen könnte, an denen die Chromosomen in unmittelbarem Kontakt liegen (Kontakthypothese). — STADLER (1932) nahm an, daß die Stellen, die neue Verbindungen eingehen, zunächst brechen und daß die Bruchenden sich später untereinander vereinigen (Bruchhypothese).

Beide Hypothesen sind in dieser ursprünglichen Formulierung nicht unbedingt gegensätzlich. Später ist dagegen vielfach durch Einbeziehung strahlen genetischer Gesichtspunkte ein Gegensatz derart konstruiert worden, daß entsprechend der Treffertheorie der Genmutationsauslösung nach der Kontakthypothese für die Auslösung einer Verlagerung ein Treffer im Kontaktpunkt genügen sollte, während nach der Bruchhypothese für jeden Einzelbruch ein Treffer notwendig sei, für die Verlagerung also mindestens zwei.

Zwischen beiden Mechanismen müßte sich unter dieser zusätzlichen Annahme durch die Bestimmung der Abhängigkeit von der Strahlendosis eine Entscheidung fällen lassen können; nach der Kontakthypothese sollte sich eine direkte Proportionalität zur Dosis ergeben, während nach der Bruchhypothese eine exponentielle Abhängigkeit zu erwarten wäre.

Aus zwei Gründen aber liegen die Verhältnisse nicht so einfach. Einerseits wirken bestimmte Arten von Chromosomenmutationen letal — nämlich alle, die neue Chromosomen mit zwei Spindelansätzen ergeben. Dieses hat zur Folge, daß nur ein Teil der induzierten Mutationen erfaßt wird. CATCHESIDE hat versucht, diesen Faktor durch Rechnungsbeispiele zu erfassen (auf Einwände wird unten eingegangen werden). Andererseits sind biophysikalische Mechanismen vorstellbar — und für andere Fälle bekannt —, nach denen auch auf dem Boden der Kontakthypothese eine Zwei- oder Mehrtrefferkurve zu erwarten wäre, dann nämlich, wenn die Umordnung mehr als einen Treffer an derselben Kontaktstelle erfordern würde. Um eine endgültige Entscheidung zu fällen, ist es notwendig, Methoden heranzuziehen, die sich gegenseitig ergänzen.

Die bisherigen Untersuchungen sind auf verschiedenen Wegen an die Frage der Dosisabhängigkeit herangegangen.

Die erste Methode beruht auf der Kreuzungsanalyse. In der  $F_2$  wird aus abweichenden Verhältnissen der Koppelung auf die Anwesenheit von Translokationen geschlossen. Intrachromosomale Verlagerungen können gleicherweise durch Störungen im Faktorenaustausch erkannt werden.

Eine neuere rein genetische Methode macht sich die Tatsache der Lagewirkung zunutze. Durch Dominanzstörung nach Verlagerung nahe bei dem Gen  $ci^+$  läßt

sich eine bestimmte Gruppe von Translokationen unter den Heterozygoten schon in der  $F_1$  erkennen (KHVOSTOVA und GAVRILOVA, 1935, 1938; EMMERHARDT, 1939).

Neben diese beiden Kreuzungsmethoden tritt eine mehr cytologische: die Untersuchung der  $F_1$ -Speicheldrüsenchromosomen nach P-( $\delta\delta$ -)Bestrahlung. Hierbei lassen sich fast alle Verlagerungen heterozygot unmittelbar im mikroskopischen Bild erfassen (BAUER, DEMEREC und KAUFMANN, 1938; CATCHESIDE, 1938).

Während sich mit den genannten Methoden nur der Anteil der Chromosomenmutationen erfassen läßt, der die lebensfähigen Verlagerungen umfaßt, gibt eine weitere rein cytologische Methode die Möglichkeit, auch oder nur die letalen Verlagerungen zu bestimmen. Hier werden die Mitosephasen nach Bestrahlung der vorausgehenden Interphase analysiert. Diese Methode ist erfolgreich bisher nur bei Pflanzen angewandt worden (SAX).

Der Grad der quantitativen Erfassung der Verlagerung einzelner Methoden ist verschieden und ist für die Frage der Dosisabhängigkeit von Bedeutung (vgl. S. 354). Am vollständigsten wird das Verlagerungsgeschehen durch die Speicheldrüsenmethode aufgezeigt.

Die bisherigen Untersuchungen, über die kürzlich berichtet wurde (BAUER, 1939), haben nach den verschiedenen Methoden in der Frage nach der Dosisbeziehung noch kein klares Ergebnis gebracht. Zum Teil wurden selbst nach dem gleichen Untersuchungsvorgang entgegengesetzte Befunde erhoben, so nach der Speicheldrüsenmethode von BAUER, DEMEREC und KAUFMANN einerseits und CATCHESIDE andererseits.

Aus diesem Grunde war es notwendig, die von DEMEREC, KAUFMANN und mir erhaltenen Ergebnisse an größerem Material erneut zu prüfen, wobei besonderer Wert auf eine genaue statistische Prüfung aller Ergebnisse zu legen war.

Gleichzeitig wurde die Frage noch von anderen Seiten her angegriffen; hierüber wird in den folgenden Mitteilungen berichtet werden.

## II. Untersuchungsverfahren.

Bestrahlt wurden 2–4 Tage alte  $\delta\delta$  des ingezüchteten Wildstammes *Oregon RC* mit Dosen von 1000, 2000, 3000, 4000 und 5000 r. Die Bestrahlung wurde mit einer Metalix-Röhre bei 115 kV, 10 mA unter Filterung durch 1 mm Aluminium in 30 cm Abstand vorgenommen. Die Intensität betrug unter diesen Bedingungen etwa 107 r/min. Die Dosis wurde während der Bestrahlung mit einem Hammer-Dosimeter gemessen. Um möglichst gleichmäßige Bestrahlungsergebnisse zu erreichen, wurden stets alle 5 Dosen in einem Bestrahlungsgang verabfolgt. Nach der Bestrahlung wurden die  $\delta\delta$  2–2½ Tage lang mit 2–3 Tage alten *Oregon*- $\varphi\varphi$  in Röhren belassen. Dann wurden die  $\delta\delta$  entfernt und die  $\varphi\varphi$  in 3 Passagen von 3, 2 und 4 Tagen in Flaschen gebracht. Von den verpuppungsreifen  $F_1$ -Larven wurden nur die  $\varphi\varphi$  untersucht. Alle Untersuchungen wurden an Dauerpräparaten vorgenommen (Technik vgl. BAUER und TIMOFEEFF-RESSOVSKY, 1939). Die Anzahl der P-Fliegen in den verschiedenen Dosen wurde so bemessen, daß in den 4–5 Teilversuchen jeder Dosis die Larvenausbeute in 3 Passagen zusammen ungefähr um 100 herum lag<sup>1</sup>.

In der Tabelle 1 sind die Anzahlen der P-Fliegen, der  $F_1$  (Puppen und Larven) sowie der  $\varphi\varphi$ -Larven für alle Teilversuche aufgeführt. Es ist hieraus ersichtlich, daß im Mittel nicht ganz ¾ aller  $\varphi$ -Larven (= Hälfte der  $F_1$ ) zur Untersuchung

<sup>1</sup> Für die technische Durchführung der Versuche bin ich Dr. WESCHENFELDER zu Dank verpflichtet.

kamen. Die übrigen verpuppten sich vorwiegend während der Nachtstunden. Durch Kühlstellen der Kulturen wurde ein zu starker Verlust an Material durch die Verpuppung verhindert. Da diese während der Gesamtdauer der Larvenreife gleichmäßig erfolgte, bedingt sie keinerlei Selektion des Materials. Dies wäre möglich, wenn bei ungleicher Entwicklungsgeschwindigkeit mutierter und nichtmutierter Larven nicht auf gleichmäßige Absammlung der Larven während der ganzen, 4–7 Tage dauernden Reifeperiode jeder Kultur geachtet würde.

Tabelle 1. Übersicht über das Material der neuen Versuche.

Dosis in r	Versuchs- Nr.	P-♀♀	P-♂♂	F <sub>1</sub> ges.	F <sub>1</sub> : P ♀	♀-Larven	% d. F <sub>1</sub>
1000	1a	5	10	445	89,0	123	27,6
	b	4	10	220	55,0	68	30,9
	c	3	8	199	66,3	90	45,2
	d	4	10	213	53,3	60	28,2
2000	1	16	38	1077	67,3	341	31,7
	2a	10	20	459	45,9	102	22,2
	b	10	20	415	41,5	132	31,8
	c	8	16	167	20,9	76	45,5
3000	d	5	10	245	30,6	90	36,7
	2	36	66	1286	35,7	400	31,1
	3a	15	25	453	30,2	140	30,9
	b	15	25	426	28,4	143	33,6
4000	c	10	20	123	12,3	65	52,8
	d	20	40	440	22,0	135	30,7
	3	60	110	1442	24,0	483	33,5
	4a	25	40	379	15,2	102	29,6
5000	b	25	40	250	10,0	80	32,0
	c	24	40	173	7,2	75	43,4
	d	25	40	244	9,8	73	29,9
	4	99	160	1046	10,6	330	31,5
5000	5a	50	80	331	6,6	124	37,5
	b	50	80	245	4,9	87	35,5
	c	46	80	175	3,8	85	48,6
	d	50	80	328	6,6	101	30,8
	e	50	80	564	11,3	141	25,0
	5	246	400	1643	6,7	538	32,7
1–5		—	—	6494	—	2092	32,2

Aus der Verteilung der Mutationen ergeben sich Anhaltspunkte dafür, daß eine im Mittel verlangsamte Entwicklungszeit der mutierten Spermien vorliegt. Teilt man die Präparate jeder Serie in zwei Hälften und bestimmt die Häufigkeit der Mutationen in ihnen, so ergeben sich für Mutationen in der 1. und 2. Hälfte folgende Verhältnisse:

## 1. Hälfte 2. Hälfte

1000 r . . .	4	:	5
2000 r . . .	18	:	22
3000 r . . .	43	:	42
4000 r . . .	54	:	50
5000 r . . .	97	:	143



Während für die ersten 4 Dosen keine Abweichung von der Zufallsverteilung feststellbar ist, weicht bei 5000 r das Verhältnis mit 2:3 gesichert von der Erwartung ab. Durch diese Erscheinung wird, wie gesagt, wegen der gleichmäßigen Abtastung der Larven während der Reifeperiode keine Fehlerquelle eingeführt.

Von den untersuchten ♀-Larven — sehr wenige gingen bei der Präparation verloren — war ein geringer Teil infolge technischer Fehler oder ungenügender Drüsenentwicklung unbrauchbar. Die Entscheidung, ob ein Präparat brauchbar war oder nicht, wurde immer nach Untersuchung bei schwächster Vergrößerung gefällt, bei der sich über den Eignungszustand (richtiger Grad der Chromosomenausbreitung) ein sicheres Urteil fällen ließ. Die Prozentsätze unbrauchbarer Präparate sind bei allen Dosen gleichmäßig niedrig (1000 r 2,9%; 2000 r 3,6%; 3000 r 3,5%; 4000 r 4,8%; 5000 r 2,4%) stellen also ebenfalls keine Fehlerquelle dar.

Zu dem neuen Material wurde ein Teil des in der Arbeit von DEMEREC, KAUFMANN und mir untersuchten Materials, und zwar alle von mir untersuchten ♀-Larven der Kreuzung *Oregon R* × *Oregon R* (bestrahlt) hinzugenommen. Über die Bestrahlungsart gibt die genannte Arbeit Auskunft. Dieses Material umfaßt folgende Anzahlen: 1000 r 331, 2000 r 277, 3000 r 312, 4000 r 162, 5000 r 121. Für die quantitative Auswertung mußte hiervon ein Teil ausgeschaltet werden (vgl. unten).

Bei der cytologischen Analyse wurden alle Lagebestimmungen nach den Chromosomenkarten von BRIDGES (1935) vorgenommen. Die von ihm (1938) für das X-Chromosom vorgenommenen geringen Änderungen der Einteilung wurden nicht berücksichtigt.

### III. Die Dosisproportionalität.

#### 1. Mutierte Spermien.

Das Material der neuen Versuche umfaßt 2001 analysierte Spermien. Hierzu kommen von früheren Versuchen (BAUER, DEMEREC und KAUFMANN) 919 Spermien. In den letzteren sind alle die Bestrahlungsversuche nicht enthalten, die weniger als 20 F<sub>1</sub>-Larven ergaben. Hier lag der Verdacht sekundärer Störungen vor. Von den verbleibenden Versuchen wurden weitere 2 nicht berücksichtigt. Unter den 1000 r-Bestrahlungen war ein Versuch mit einer Mutationsrate von  $13,64 \pm 5,17$  ( $n = 44$ ), einem Wert, der vollständig aus dem Streubereich (1,54—3,33%) der übrigen Versuche herausfiel. Nach der Homogenitätsprüfung mit der  $\chi^2$ -Methode ergab sich mit dem Versuche ein P von  $< 0,01$ , ohne ihn eines von 0,50—0,30. Auch bei der 3000 r-Serie lag ein Wert sehr hoch:  $30,52 \pm 3,71$  ( $n = 154$ ), während die übrigen normal streuten. Beide angeführten Versuche sind deshalb wohl auf Bestrahlungsfehler zurückzuführen und können für die quantitative Analyse unberücksichtigt bleiben, für die also im ganzen 2920 Spermien ausgewertet wurden.

Die Versuchsergebnisse über den Prozentsatz mutierter Spermien sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die Mutationshäufigkeit steigt von 2,44% bei 1000 r auf 44,90% bei 5000 r. Für jede Dosis liegen mehrere Beobachtungen in 2 Serien vor, die übereinstimmende Werte ergeben haben. Die vorletzte Spalte der Tabelle 2 gibt für jede der beiden Versuchsgruppen den Wahrscheinlichkeitswert nach der  $\chi^2$ -Methode für Homogenität des Materials innerhalb der verschiedenen Bestrahlungsgruppen an; in der letzten Spalte ist der Homogenitätswert für die 3 Folgekulturen jeder Bestrahlung in der neuen Versuchsgruppe angeführt.

Für das Gesamtmaterial ist die Homogenitätsprüfung zwischen beiden Versuchen angegeben. Diese P-Werte zeigen allgemein die völlige Vergleichbarkeit des zusammengefaßten Materials. Kritische Werte liegen nur innerhalb der neuen Versuche für die 5000 r-Versuche vor.

Tabelle 2. Häufigkeit mutierter Spermien.

	Dosis in r	Anzahl der unter- suchten Spermien	Chromosomal mutierte Spermien		Zahl der Exper.	P für Homogenität in	
			n	% $\pm$ m. %		versch. Bestr.	Parallel- kulturen
Neue Versuche	1000	329	9	2,74 $\pm$ 0,90	4	0,98—0,95	0,70—0,50
	2000	377	40	10,61 $\pm$ 1,58	4	0,70—0,50	0,50—0,30
	3000	463	84	18,14 $\pm$ 1,79	4	0,50—0,30	0,50—0,30
	4000	309	104	33,66 $\pm$ 2,69	4	0,30—0,20	0,80—0,70
	5000	523	239	45,70 $\pm$ 2,18	5	0,05—0,02	0,98—0,95
Frühere Ver- suche	1000	287	6	2,09 $\pm$ 0,84	2	0,50—0,30	—
	2000	277	24	8,66 $\pm$ 1,69	3	0,95—0,90	—
	3000	132	28	21,21 $\pm$ 3,56	3	0,50—0,30	—
	4000	138	40	28,99 $\pm$ 3,86	2	0,50—0,30	—
	5000	85	34	40,00 $\pm$ 5,31	2	0,50—0,30	—
Gesamt- material	1000	616	15	2,44 $\pm$ 0,62	je 2 Grup- pen	0,70—0,50	—
	2000	654	64	9,79 $\pm$ 1,16		0,50—0,30	—
	3000	595	112	18,82 $\pm$ 1,60		0,50—0,30	—
	4000	447	144	32,21 $\pm$ 2,21		0,50—0,30	—
	5000	608	273	44,90 $\pm$ 2,02		0,50—0,30	—

In diesen liegt der P-Wert gerade unter der von FISHER gezogenen Brauchbarkeitsgrenze (0,05). Bei der größeren Streuung, die nach allgemeinen Erfahrungen in Mutationsversuchen auftritt, kann aber diese Grenze etwas weiter gefaßt werden. Weiter fällt in den neuen Versuchen die mit steigender Dosis zunehmende Streuung auf, die sich in dem regelmäßig kleiner werdenden P ausdrückt. Hierin liegt wohl der Ausdruck für die auch bei direkter Dosismessung auftretende Messungsungenauigkeit, wofür auch die Homogenität innerhalb der Passagen jedes Teilversuches spricht.

Die Mutationshäufigkeiten bei den einzelnen Dosen ergeben eine regelmäßige, den unteren Teil einer S-förmigen darstellende Kurve (Abb. 1), deren Wendepunkt zwischen 4000 r und 5000 r liegt<sup>1</sup>. Zum

<sup>1</sup> Wird das gesamte Material ohne Rücksicht auf die Homogenität zur Berechnung der Mutationsraten benutzt, so ergeben sich folgende Prozentsätze:

	1000 r	2000 r	3000 r	4000 r	5000 r
n =	660	654	775	471	644
Mut.-% =	3,18 $\pm$ 0,68	9,79 $\pm$ 1,16	21,68 $\pm$ 1,48	31,85 $\pm$ 2,15	44,25 $\pm$ 1,96
Diff $\pm$ m <sub>Diff</sub>	+ 0,74 $\pm$ 0,92	—	+ 2,86 $\pm$ 2,18	— 0,36 $\pm$ 3,04	— 0,65 $\pm$ 2,81

In allen Fällen sind die so bestimmten Werte statistisch nicht von den in Tabelle 1 angeführten verschieden. Die Differenz zwischen ihnen ist jeweils kleiner als 1,5. Die Inhomogenität beruht demnach nur auf größerer Streuung der ausgeschlossenen Einzelversuche. Ein Fehler wird also durch den Ausschluß der angegebenen Versuche nicht gemacht.

Vergleich sind die von BAUER, DEMEREC und KAUFMANN sowie von CATCHESIDE angegebenen Kurven in der Abb. 1 mit eingetragen. Während sich erstere Kurve der hier gegebenen im ganzen (außer dem 3000r-Wert) anpaßt, läuft die von CATCHESIDE annähernd gradlinig vom Nullpunkt zum 4000r-Wert. Welche Fehlerquellen den nur mit geringem Material durchgeführten Bestimmungen CATCHESIDES zugrundeliegen, läßt sich nicht nachprüfen.

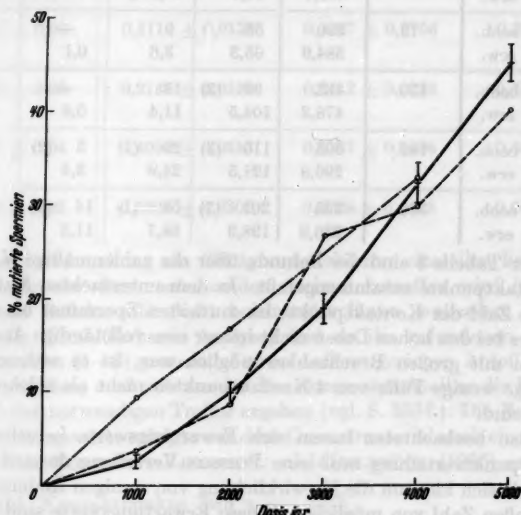


Abb. 1. Dosisabhängigkeit chromosomal mutierter Spermien. — Kurve auf Grund des bisher behandelten Materials; --- nach BAUER, DEMEREC und KAUFMANN; —·— nach CATCHESIDE. Die für die neue Kurve angegebenen Fehlerbreitenstellen  $\pm 1$  m dar.

Weil die Kurve der Mutationshäufigkeiten nur den Prozentsatz von Mutationen unter den überlebenden Zygoten angibt, lassen sich aus ihr unmittelbare Schlüsse über die zugrunde liegenden quantitativen Gesetzmäßigkeiten nicht ziehen. Soviel aber steht fest, daß eine lineare Abhängigkeit in der Art wie bei Genmutationen nicht vorliegt (vgl. S. 354).

## 2. Die Kontaktpunkte und Brüche.

Da nach Röntgenbestrahlung Ein-Bruch-Mutationen höchstens ganz selten vorkommen (vgl. S. 376), ist die feststellbare Mutationseinheit der Kontaktpunkt. Als solcher wird ohne die Unterstellung ursprünglicher räumlicher Zuordnung jede Gruppe von 2 oder mehr Bruchstellen bezeichnet, deren Endabschnitte eine gemeinsame Neukombination eingehen.

Tabelle 3. Verteilung  
(Die eingeklammerten Zahlen geben die unsicheren Fälle an, in denen

Dosis in r		Anzahl der Kontakt- punkte	Anzahl der Spermien mit Kontaktpunkten				
			0	1	2	3	4
1000	beob.	15	601	15	—	—	—
	erw.		601,1	14,7	0,2	—	—
2000	beob.	73	590	55	9	—	—
	erw.		584,9	65,3	3,6	0,1	—
3000	beob.	130	483	94 (2)	18	—	—
	erw.		478,2	104,5	11,4	0,8	—
4000	beob.	183	303	110 (3)	29 (1)	5 (2)	—
	erw.		296,8	121,5	24,9	3,4	0,3
5000	beob.	359	335	201 (7)	58 (1)	14 (2)	—
	erw.		336,9	198,9	58,7	11,6	1,7

In der Tabelle 3 sind die Befunde über die zahlenmäßige Verteilung der Kontaktpunkte zusammengefaßt. In dem untersuchten Material beträgt die Zahl der Kontaktpunkte im mutierten Spermium bis zu 3. Da besonders bei den hohen Dosen nicht immer eine vollständige Analyse der Spermien mit großen Bruchzahlen möglich war, ist es wahrscheinlich, daß einige wenige Fälle von 4 Kontaktpunkten nicht als solche erkannt worden sind.

Zu den beobachteten lassen sich Erwartungswerte berechnen. Die Kontaktpunktverteilung muß eine POISSON-Verteilung darstellen; denn es handelt sich hier um die Verwirklichung von wenigen Änderungen aus einer großen Zahl von möglichen. Diese Erwartungswerte sind ebenfalls im linken Teil der Tabelle 3 eingefügt. Schon der bloße Vergleich zeigt, daß bei allen Dosen eine weitgehende Übereinstimmung beider Zahlenreihen besteht. Zur genaueren statistischen Prüfung wurde für jede Dosis der Mittelwert mit der Varianz ( $\sigma^2$ ) verglichen. Beide Werte sollen bei der Poisson-Verteilung gleich sein. Der sich für den Quotienten  $(M - \sigma^2):m_{\sigma^2}$  (Differenz von Mittelwert und Varianz dividiert durch den mittleren Fehler der Varianz) ergebende Wahrscheinlichkeitswert  $P$  in der letzten Spalte bestätigt die Übereinstimmung von Erwartung und Beobachtung. Bei 1000 r ist er deshalb so hoch, weil nur 2 Klassen vorkommen und weil der theoretische Wert für 2 Kontaktpunkte sehr niedrig ist. In den Klassen von 2000—4000 r ist die Anzahl der beobachteten Fälle mit 2 Kontaktpunkten höher als erwartet. Da aber bei 5000 r die gleiche Differenz nicht zu beobachten ist, muß es offenbleiben, ob sie eine Regelmäßigkeit anzeigt.

Mit steigender Dosis steigt also sowohl die Zahl der Kontaktpunkte im mutierten Spermium als auch die Anzahl der neu mutierten Spermien. Da sich bei den Kontaktpunkten als Mutationseinheiten bei der cyto-

der Kontaktpunkte.

möglicherweise eine höhere Anzahl von Kontaktpunkten vorkam.)

Mittlere Anzahl pro		$\sigma^2 \pm m_{\sigma^2}$	P von Diff. ( $M^t - \sigma^2$ ) : $m_{\sigma^2}$
mut. Spermium $M^m \pm m_m$	Spermium $M^t \pm m_t$		
1,00	0,0244 $\pm$ 0,0062	0,0238 $\pm$ 0,0064	> 0,99
1,14 $\pm$ 0,04	0,1116 $\pm$ 0,0139	0,1267 $\pm$ 0,0156	0,33—0,34
1,16 $\pm$ 0,03	0,2185 $\pm$ 0,0197	0,2312 $\pm$ 0,0238	0,45—0,46
1,27 $\pm$ 0,04	0,4094 $\pm$ 0,0313	0,4387 $\pm$ 0,0408	0,48—0,49
1,32 $\pm$ 0,03	0,5905 $\pm$ 0,0306	0,5708 $\pm$ 0,0448	0,65—0,66

logischen Untersuchung ein Sättigungseffekt nur einstellen kann, wenn eine der Bruchstellen nacheinander zweimal betroffen wird (praktisch, wenn zwei Brüche sehr dicht beieinander liegen, außerdem bei nicht vollständig durchführbarer Analyse) und da die gefundenen Kontaktpunktzahlen (1—3) prozentual einen äußerst geringen Anteil der möglichen darstellen, muß sich aus der Dosiskurve unmittelbar die Beziehung zur Zahl der notwendigen Treffer ergeben (vgl. S. 355f.). Die Berechnung der Erwartungswerte erfolgte aus dem Gesamtmaterial nach einer Formel, die der von TIMOFÉEFF-RESSOVSKY und DELBRÜCK (1936) entspricht:

$$\text{Anzahl Kontaktpunkte pro } r = \frac{\sum n_i}{\sum n_i \cdot D_i^p}$$

Hierin bedeutet  $n_i$  die Anzahl der Kontaktpunkte je Dosis,  $N_i$  die Anzahl der untersuchten Individuen je Dosis und  $D_i^p$  die jeweilige Dosis mit dem Proportionalitätsexponenten  $p$ , der bei geradliniger Abhängigkeit = 1 ist, bei quadratischer Proportionalität = 2 usw. Durch diese Berechnungen erhält man für verschiedene Werte von  $p$  verschiedene Ausgangswerte, die, mit  $D_i^p$  multipliziert, die verschiedenen Proportionalitätswerte für die höheren Dosen ergeben. Aus der Tabelle 4 und der

Tabelle 4. Dosisproportionalität der Kontaktpunkte und Brüche.

Dosis in r	Mittlere Kontaktpunktzahl			Mittlere Bruchanzahl		
	beobachtet	erwartet		beobachtet	erwartet	
		$D^1$	$D^2$		$D^1$	$D^2$
1000	0,0244 $\pm$ 0,0062	0,0890	0,0246	0,0552 $\pm$ 0,0145	0,2091	0,0577
2000	0,1116 $\pm$ 0,0139	0,1780	0,0983	0,2370 $\pm$ 0,0297	0,4182	0,2308
3000	0,2185 $\pm$ 0,0197	0,2671	0,2211	0,4924 $\pm$ 0,0457	0,6372	0,5192
4000	0,4094 $\pm$ 0,0313	0,3561	0,3930	0,9553 $\pm$ 0,0783	0,8364	0,9231
5000	0,5905 $\pm$ 0,0306	0,4451	0,6141	1,4408 $\pm$ 0,0803	1,0554	1,4424

Abb. 2 (untere Kurve) ergibt sich, daß die theoretischen und die praktischen Werte fast vollkommen bei  $p = 2$ , also quadratischer Dosisproportionalität übereinstimmen. Diese Übereinstimmung zeigt, daß für die Auslösung eines Kontaktpunktes zwei Treffer erforderlich sind.

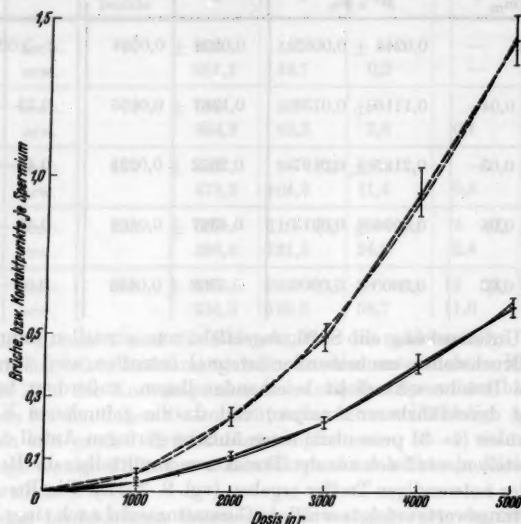


Abb. 2. Dosisabhängigkeit von Kontaktpunkten und Einzelbrüchen. Kurve für Kontaktpunkte (—) und Brüche (---). Zu jeder Kurve ist dünn angezogen die berechnete Exponentialkurve eingerechnet.

Tabelle 5. Verteilung

(Die eingeklammerten Zahlen geben die unsicheren Fälle an, in denen möglicherweise pro Kontakt-

Dosis in r	Anzahl der Brüche	Kontakt- punkte pro Sper- mium	Brüche pro Spermium									
			2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1000	34	1	12	2	1	—	—	—	—	—	—	—
2000	155	1	47	8	—	—	—	—	—	—	—	—
		2	—	8	1	—	—	—	—	—	—	
3000	293	1	74	14	6 (2)	—	—	—	—	—	—	—
		2	—	13	3	2	—	—	—	—	—	
4000	427	1	86	17	6 (2)	—	1 (1)	—	—	—	—	—
		2	—	21	3	4	—	—	1 (1)	—	—	
		3	—	—	—	—	3	—	—	1 (1)	1 (1)	
5000	876	1	149	32	14 (5)	3	3 (2)	—	—	—	—	—
		2	—	—	30	12	9	4	3	1	—	1 (1)
		3	—	—	—	—	6	2	1	1 (1)	2 (1)	—



Die Anzahl der Brüche, die einen Kontaktpunkt bilden, liegt in diesen Versuchen zwischen 2 und 7. Dabei ist der Unterschied der mittleren Bruchanzahl pro Kontaktpunkt bei den einzelnen Dosen nicht sehr verschieden; diese Werte betragen von 2,12—2,44 (Tabelle 5). Sie steigen etwa gradlinig mit der Dosis an (der hohe Wert bei 1000 r ist nur eine Folge der geringen Gesamtanzahl der Kontaktpunkte). Die Unterschiede zwischen 2000 und 3000 r einerseits und 5000 r andererseits sind statistisch gesichert; allerdings würden sich die hohen Werte etwas erniedrigen, wenn in den nicht voll analysierbaren Spermien bei den angegebenen Kontaktpunkten mit 4—7 Brüchen in Wirklichkeit teilweise mehrere Kontaktpunkte vorgelegen hätten. Aber selbst wenn man den unwahrscheinlichen Grenzfall annimmt und diese Fälle sämtlich als multiple Kontaktpunkte mit den kleinstmöglichen Bruchzahlen (2 bzw. 3) einrechnet, ergeben sich folgende Werte für 3000, 4000 und 5000 r:  $2,22 \pm 0,04$ ,  $2,24 \pm 0,04$ ,  $2,33 \pm 0,04$ . Auch dann ist der Unterschied zwischen 2000 und 5000 r noch gesichert ( $\text{Diff}/m_{\text{Diff}} = 3,8$ ;  $P < 0,001$ ).

Als Anzahl der Brüche in einem mutierten Spermium wurden 2—11 festgestellt; bei den einzelnen Dosen nimmt der Mittelwert von 2,27—3,21 zu (Tabelle 5). Auch dieser Anstieg ist etwa gradlinig proportional zur Dosis. Die Zunahme der Brüche im mutierten Spermium wird also einmal durch höhere Bruchzahl pro Kontaktpunkt, zum anderen — und in etwas stärkerem Maße — durch Vermehrung der Anzahl der Kontaktpunkte bewirkt, die im Mittel von 1,00 bei 1000 r auf 1,32 bei 5000 r ansteigen (Tabelle 3).

Bei der quadratischen Dosisproportionalität der Kontaktpunktauslösung und der nicht so sehr unterschiedlichen Kontaktpunkt-Bruchzahl bei den verschiedenen Dosen ist zu erwarten, daß auch die der Brüche.

weise eine höhere Anzahl von Kontaktpunkten vorkam und die Zahl der Brüche punkt entsprechend kleiner war.)

Mittlere Bruch- zahl pro mutiertes Spermium	Brüche pro Kontaktpunkt						Mittlere Bruch- zahl pro Kontaktpunkt
	2	3	4	5	6	7	
$2,27 \pm 0,15$	12	2	1	—	—	—	$2,27 \pm 0,15$
$2,42 \pm 0,10$	64	9	—	—	—	—	$2,12 \pm 0,04$
$2,62 \pm 0,09$	104	19	7 (2)	—	—	—	$2,25 \pm 0,05$
$2,97 \pm 0,13$	144	26	9 (2)	—	3 (2)	1 (1)	$2,33 \pm 0,06$
$3,21 \pm 0,11$	265	52	27 (7)	9 (1)	5 (4)	1	$2,44 \pm 0,05$

mittlere Bruchzahl mit dem Quadrat der Dosis steigt. Diese Erwartung wird durch die Rechnung bestätigt (Tabelle 4). Abb. 2 (obere Kurve) zeigt, daß alle Einzelwerte, wie auch schon bei der mittleren Kontaktpunktzahl, die in entsprechender Weise wie für die Kontaktpunkte berechnete Erwartungskurve im Bereich ihrer einfachen mittleren Fehler decken, daß sich also auch hier die vollständige Übereinstimmung mit quadratischer Proportionalität ergibt.

Oben wurde erwähnt, daß das untersuchte Material nur den überlebenden Anteil der Chromosomenmutationen darstellt. Wie es CATCHESIDE genauer diskutiert hat, kann angenommen werden, daß einem beobachteten 2-Bruch-Kontaktpunkt einer entspricht, der zu Wiedervereinigung der zusammengehörigen Bruchenden geführt hat, also von nicht mutiert ununterscheidbar ist, und einer, der bizentrische Chromosomen ergibt und dadurch zu Zygotenletalität führt. Da CATCHESIDE nur mit freier Kombinierbarkeit aller Brüche gerechnet hat, beruhen seine Werte alle auf der Letalität durch bizentrische Kombinationen in einem Kontaktpunkt. Bei mehreren Kontaktpunkten ergeben sich die im folgenden angeführten Verhältnisse. Auf Grund der beobachteten Kontaktpunkthäufigkeiten läßt sich eine Überschlagsrechnung für die Gesamtheit der chromosomal mutierten Spermien durchführen. Bei einem Kontaktpunkt ist dabei das Verhältnis von nicht erkennbar mutierten Spermien zu lebensfähig mutierten zu letal mutierten Spermien 1:1:1, bei zwei Kontaktpunkten 1:3:5, bei drei 1:7:19 und bei vier Kontaktpunkten 1:15:65. Der Einfachheit halber sind hierbei alle Kontaktpunkte als 2er Brüche gewertet. Die sich so ergebenden Werte für mutierte Spermien sind in der Tabelle 6 angeführt und in Abb. 3 kurvenmäßig dargestellt. Da Kontaktpunkte mit 3 und mehr Brüchen nicht ein 1:1:1-Verhältnis, sondern eines mit höherem Anteil der bizentrischen Letalität bewirkenden Mutationen ergeben, würden sich die Zahlen besonders für die höheren Dosen stärker verschieben und eine etwas steilere Kurve ergeben. Ebenso würde sich die Kurve etwas ändern, wenn die Wahrscheinlichkeit für Wiederherstellung der Ausgangsordnung höher als die für Umlagerung wäre. Der Kurve sind in Abb. 3 theoretische Trefferkurven gegenübergestellt, die den 50%-Wert mit ihr gemeinsam haben. Aus dem Vergleich dieser Kurven zeigt sich also, daß die berechneten Werte für die niedrigen Dosen zwischen der

Tabelle 6. Gesamtmutabilität.

Dosis	Nicht mutiert	Mutiert			Berechnete Gesamtanzahl der Zygoten	Davon mutiert		% der letalen Zygoten
		+	Chr. M.	I. M.		n	% $\pm$ m-%	
1000	586	15	15	15	631	45	7,1 $\pm$ 1,0	2,4
2000	544	46	64	82	736	192	29,4 $\pm$ 1,7	11,1
3000	407	76	112	148	743	336	45,2 $\pm$ 1,8	18,9
4000	217	86	144	232	679	462	68,0 $\pm$ 1,8	34,2
5000	178	157	273	473	1081	903	83,5 $\pm$ 1,1	43,8

2- und der 3-Treffer-Kurve liegen, während die der höheren Dosen über der 3-Treffer-Kurve liegen. Eine nach den angeführten Gesichtspunkten korrigierte Kurve würde sich der 3-Treffer-Kurve weitgehend anpassen.

Der sich aus der angegebenen Berechnung ergebende Anteil der absterbenden Zygoten ist in der rechten Spalte der Tabelle 6 eingetragen. Auch diese Werte folgen ungefähr einer S-förmigen Kurve.

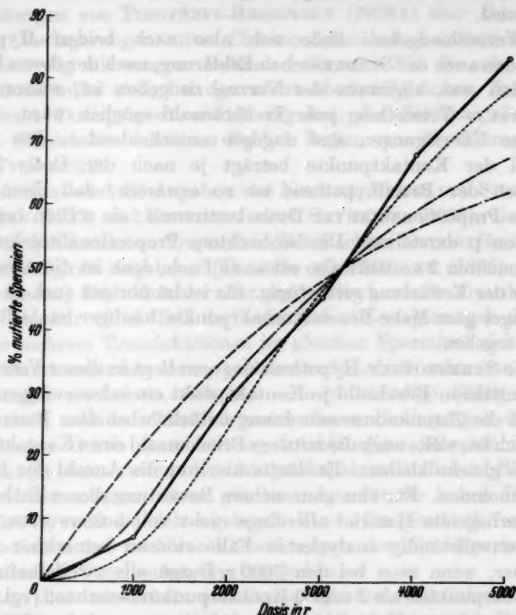


Abb. 3. Berechnete Gesamtmutabilität. — Kurve für die berechneten Werte, verglichen mit Trefferkurven für 1 Treffer (---), 2 Treffer (-.-) und 3 Treffer (....).

Da sie alle nur unter der Annahme von nur 2 Brüchen pro Kontaktpunkt berechnet sind, muß die Kurve wegen der höheren Zahl nichtlebensfähiger Rekombinationen bei 3- und Mehrbruch-Kontaktpunkten erheblich steiler verlaufen und fällt damit in den experimentell gefundenen Bereich der Eisterblichkeit (REUSS, unveröffentlicht, nach persönlicher Mitteilung). Es ist also sehr wahrscheinlich, daß die Eisterblichkeit allein auf bizentrischen Chromosomenmutationen beruht; jedenfalls kann der etwaige Anteil von dominanten Letalfaktoren nur von geringerer Bedeutung sein.

### 3. Besprechung.

Aus den quantitativen Befunden ergibt sich als wichtigste Feststellung, daß zu einem Kontaktpunkt zwei Treffer notwendig sind.

Diese Feststellung läßt nach der Hypothese von STADLER den Schluß zu, daß die Einzelbrüche durch einen Treffer ausgelöst werden und also zwei unabhängige Ereignisse zu einer Chromosomenmutation führen.

Für die SEREBROVSKYSche Hypothese dagegen würde das Ergebnis besagen, daß erst zwei Treffer zur Auslösung der Umkombination an der Kontaktstelle wirksam sind und durch einen allein keine Veränderung erreicht wird.

Das Versuchsergebnis ließe sich also nach beiden Hypothesen deuten, wenn auch der STADLERSchen Erklärung, nach der dieses Resultat zu erwarten war, allgemein der Vorzug zu geben ist, während nach SEREBROVSKYs Vorstellung jede Trefferanzahl möglich wäre.

Weitere Überlegungen sind dagegen entscheidender. Die mittlere Bruchzahl der Kontaktpunkte beträgt je nach der Dosis 2,12 bis 2,44. Nach der Bruchhypothese ist zu erwarten, daß diese Bruchzahlen die Proportionalität zur Dosis bestimmen; sie sollten bei  $D^p$  den Exponenten  $p$  darstellen. Die beobachtete Proportionalitätskurve mit dem Exponenten 2 verläuft also etwas zu flach, doch ist die Abweichung gegenüber der Erwartung geringfügig. Sie ist im übrigen auch zu fordern, da die angelegten Mehr-Bruch-Kontaktpunkte häufiger letale Rekombinationen ergeben.

Für die SEREBROVSKY-Hypothese dagegen liegt in dieser Verschiedenheit der mittleren Bruchzahl je Kontaktpunkt ein schwerwiegender Einwand. Da die Chromosomenanordnung natürlich bei allen Bestrahlungsdosen gleich ist, sollte auch die mittlere Bruchanzahl eines Kontaktpunktes immer die gleiche bleiben. Es dürfte hier nur die Anzahl der Kontaktpunkte zunehmen. Für eine ganz sichere Bewertung dieses Tatbestandes ist das vorliegende Material allerdings nicht voll auszuwerten, da sich hier die unvollständig analysierten Fälle störend bemerkbar machen. Selbst aber, wenn man bei den 5000 r Daten alle zweifelhaften Fälle von Kontaktpunkten als 2 oder 3 Kontaktpunkte berechnet (vgl. S. 353), bleibt ein gesicherter Unterschied zwischen diesem und dem 2000r-Wert, also eine gesicherte Zunahme der Bruchzahl pro Kontaktpunkt mit Dosissteigerung. Damit ist ausgeschlossen, daß die Auslösung eines Kontaktpunktes ein einheitliches Primäreignis darstellt. Die Befunde müssen also nur auf dem Boden der STADLERSchen Hypothese gedeutet werden.

Ein Vergleich der hier angegebenen Dosisbeziehung mit den Befunden anderer Untersucher ergibt Übereinstimmungen und Unterschiede. Daß die früheren Werte von BAUER, DEMERCO und KAUFMANN<sup>1</sup> eine brauchbare Übereinstimmung zeigen, die von CATCHESIDE nicht, ist

<sup>1</sup> Bei der Angabe der Gesamtbrüche für die einzelnen Dosen ist ein schlimmer Fehler in der Tabelle 1 dieser Arbeit enthalten. In den beiden letzten Zeilen sind die Bruchzahlen in Prozenten, die Fehler in Einheiten angegeben. Letztere sind also mit 100 zu multiplizieren.

schon oben erwähnt. Die Ergebnisse von SAX (1938) an *Tradescantia*-Mikrosporen sind in vollem Einklang mit den hier mitgeteilten. Die empirische Kurve von SAX verläuft steiler als die zum Vergleich berechnete 2-Treffer-Kurve, liegt also ähnlich der unserer Abb. 3 zwischen einer 2- und einer 3-Treffer-Kurve<sup>1</sup>.

Von den weiteren Ergebnissen an *Drosophila melanogaster* stimmen die Beobachtungen von TIMOFEEFF-RESSOVSKY (1939 b) über den Prozentsatz von Verlagerungen unter Chromosomen mit Letalfaktoren ebenfalls vollständig mit unseren Befunden überein. Für die sehr niedrigen Prozentsätze sollte sich, bei den nicht übermäßig hohen Zahlen, eine quadratische Dosisproportionalität ergeben, der Sättigungsfaktor also noch im Bereich des mittleren Fehlers liegen, eine Forderung, die das Material voll erfüllt.

Abweichend sind die Angaben von MULLER, MAKKI und SIDKY (1939), BELGOVSKY (1937) und KHVOSTOVA und GAVRILOVA (1938), die statt der erwarteten quadratischen Proportionalität flachere Kurven für die Translokationshäufigkeit angeben. [Dasselbe gibt MULLER (1938) für lange Deficiencies an.] Da es sich hier aber um genetisch erfaßte Translokationen handelt, die nur einen Teil der induzierten Verlagerungen darstellen, da weiter mehrere Translokationen im gleichen Spermium sich meistens nicht getrennt erkennen lassen und entweder als 3- oder nur 2-Bruchverlagerungen erscheinen, sich also eine vollständige Sättigungskurve ergeben muß, und da schließlich unter diesen Bedingungen die letalen Verlagerungen durch Ausschaltung unabhängiger lebensfähiger Verlagerungen (in einem zweiten Kontaktpunkt) als zusätzlicher „Sättigungsfaktor“ wirken müssen (dieses gilt besonders für die hohen Dosen von 4000–6000 r), muß die sich ergebende Kurve für genetisch festgestellte Translokationen den flacheren Verlauf zeigen, den die Experimente der oben genannten Untersucher ergeben haben.

MULLER hat wiederholt als Dosisproportionalitätsfaktor den Exponenten 1,5 angegeben und hieraus den Schluß gezogen (1938), daß in den beobachteten Verlagerungen ein Gemisch vorläge; einige würden durch 2 Treffer, einige nur durch einen ausgelöst. Abgesehen davon, daß alle Versuche MULLERs nur auf zwei Dosiswerten beruhen (die man jeder Trefferkurve einpassen kann), ist aber nach den obigen Gründen die abgeflachte Kurve als eine übersättigte 2-Treffer-Kurve zu werten. Es sind also Schlüsse auf direkte Proportionalität auch nur eines Teiles der beobachteten Chromosomenmutationen nicht gerechtfertigt.

<sup>1</sup> Da SAX die von ihm berechneten theoretischen Kurven nur im 150 r-Punkt zur Deckung gebracht hat, statt wie üblich den 50%-Punkt zu berücksichtigen, sieht es in seiner Abb. (Tab. 7) so aus, als ob die empirischen Werte zwischen den von einer 1- und einer 2-Treffer-Kurve geforderten lägen. Hieraus scheint auch MULLER (1938) den Schluß gezogen zu haben, daß die beobachtete Abhängigkeit von der Dosis einem Exponenten 1,5 entspräche. Ebenso entscheiden sich DEMEREC und KAUFMANN (1938) für eine derartige Proportionalität.

Berechnet man aus den zu Tabelle 1 gegebenen Werten für mutierte Spermien eine Dosisproportionalität ohne Rücksicht auf den Einfluß der Sättigung, so ergibt sich auch hier als der beobachteten Steigerung der Mutationshäufigkeit am ähnlichsten eine Exponentialkurve mit dem Exponenten 1,5.

Eine besondere Gruppe von Translokationen, die durch Auftreten einer Lagewirkung erkannt werden, in erster Linie Translokationen mit einem Bruch an oder nahe bei  $ci^+$  (KHOVOSTOVA und GAVRILOVA, 1935, 1938; EBERHARDT, 1939) und neuerdings auch bei  $Pl$  (KHOVOSTOVA und GAVRILOVA, 1938) unterscheidet sich in ihrer Dosisproportionalität von den bisher besprochenen. Diese Translokationen zeigen direkte Proportionalität zur Dosis, jedenfalls im Bereich der höheren Dosen. Sie lassen sich bisher noch am besten so deuten, daß zwei Brüche verschiedener Wahrscheinlichkeit sich kombinieren, von denen der nicht durch Lagewirkung festgelegte Bruch praktisch immer für die Kombination mit dem bestimmten bei  $ci^+$  oder  $Pl$  zur Verfügung steht. Hieraus ergibt sich, daß durch die Analyse eigentlich nur die Häufigkeit des bestimmten Bruches erfaßt wird, der dann direkt proportional zur Dosis auftreten würde (vgl. BAUER, 1939; BAUER, DEMEREC und KAUFMANN, 1938).

Es ist also möglich, alle verschiedenen Versuchsergebnisse einheitlich auf dem Boden der STADLERSchen Hypothese so zu deuten, daß sich unabhängige Brüche zu zwei oder mehreren zu den stabilen Verlagerungen vereinigen. Nach Prüfung der Bruchverteilung wird sich noch ein genaueres Bild von dem Mechanismus des Ursprunges der Chromosomenmutationen entwerfen lassen.

#### IV. Die Bruchverteilung.

##### 1. Die Lokalisation der Brüche.

Für den Zweck der Arbeit genügte es, die Zugehörigkeit zu einem der 102 Unterabschnitte nach BRIDGES' Einteilung zu bestimmen. Schwierigkeiten machten hierbei nur die teilweise oder ganz heterochromatischen spindelfasernahen Abschnitte (20, 40, 41, 80, 81, 101).

Insgesamt wurden 2010 Brüche aus 688 mutierten Spermien (hierin sind die für die quantitative Untersuchung nicht verwerteten enthalten) beobachtet. Von diesen sind 1781 sicher in einem bestimmten Abschnitt lokalisiert, während die übrigen nicht sicher festgelegt werden konnten. Über die Verteilung auf Eu- und Heterochromatin gibt Tabelle 7 Auskunft.

Die nähere Analyse der heterochromatischen Brüche ist dadurch sehr erschwert, daß der hohe Satz nichtlokalisierbarer Brüche nicht notwendigerweise proportional zu den sicher lokalisierten Brüchen hinzuzuzählen ist. Nimmt man diese Proportionalität an (Tabelle 8), so ergeben sich Prozentsätze, die den Längenverhältnissen beider Chromatin-



Tabelle 7. Verteilung der Brüche auf Eu- und Heterochromatin.

Brüche im	Lokalisation				n	% aller Brüche
	sicher		unsicher			
	n	%	n	%		
Heterochromatin (20, 40, 41, 80, 81, 101)	239	59,15	165	40,85	404	20,10
Euchromatin (übrige Abschnitte)	1542	96,04	64	3,96	1606	79,90
Gesamt	1781	88,61	229	11,39	2010	

arten in den Mitosechromosomen gut entsprechen. Auf alle Fälle ist die Übereinstimmung zwischen beobachteter und erwarteter Zahl aller Heterochromatinbrüche (19,1 gegenüber 18,6) sehr gut und weist somit auf die direkte Proportionalität zwischen Bruchhäufigkeit und Heterochromatin-Metaphaselänge hin.

Tabelle 8. Verteilung der heterochromatischen Brüche.

	Chromosomen (Abschnitte)						n
	X	2		3		4	
	20	40	41	80	81	101	
Lokalisiert	93	19	55	29	23		239
Nicht lokalisiert, proportional verteilt	70	56		39		—	165
Gesamt	163	130		91		20	404
% der Gesamtbrüche	8,1	6,5		4,5		1,0	19,1 + 1,0
Metaphaselänge in %	22,7	36,5		38,8		2,0	100
Davon Heterochromatin	7,6	6,1		4,9		?	18,6 + ?

Es ist allerdings noch zu berücksichtigen, daß eine Anzahl heterochromatischer Brüche sich der Beobachtung entzieht. Alle Rekombinationen zweier heterochromatischer Brüche sind nach der Speicheldrüsenmethode nicht festzustellen. Ebenso ist nur selten zu entscheiden, ob z. B. in einem gegebenen Fall ein 3er Kontaktpunkt mit einem, oder ein 4er Kontaktpunkt mit 2 heterochromatischen Brüchen vorliegt. Es muß also die Bruchhäufigkeit des Heterochromatins noch etwas höher sein als der Proportionalität zur cytologischen Länge entspricht.

Tabelle 9. Bruchverteilung auf die Chromosomenschenkel.

Lokalisation	Chromosom						Gesamt
	X	2 L	2 R	3 L	3 R	4	
Genau	315	242	289	293	385	18	1542
Ungenau	10	26	9	10	9	—	64
Gesamt	325	268	298	303	394	18	1606
Erwartet	299,8	279,3	325,7	296,9	386,2	18,0	1605,9

$$\chi^2 = 5,214, \text{ Frgr.} = 5, P = 0,5 - 0,3.$$

Tabelle 10. Bruchhäufigkeit

	X			2 L			2 R		
	Ab-schnitte	Bruch-anzahl	Bruch-koeff.	Ab-schnitte	Bruch-anzahl	Bruch-koeff.	Ab-schnitte	Bruch-anzahl	Bruch-koeff.
	1	24	2,1	21	26	2,1	60	29	1,7
	2	19	1,0	22	16	1,6	59	27	2,4
	3	21	1,1	23	12	1,3	58	8	0,7
	4	18	1,1	24	19	2,8	57	19	1,0
	5	8	0,5	25	16	1,2	56	23	1,8
	6	12	1,1	26	14	0,9	55	17	1,3
	7	17	0,9	27	12	1,0	54	10	0,8
	8	22	0,9	28	12	0,7	53	13	0,9
	9	16	1,0	29	15	1,3	52	10	0,5
	10	10	0,5	30	14	0,8	51	15	0,8
	11	31	1,8	31	5	0,3	50	18	0,8
	12	20	1,3	32	12	1,6	49	10	0,8
	13	15	0,6	33	9	0,7	48	7	0,4
	14	19	0,9	34	17	1,2	47	16	1,1
	15	16	1,4	35	14	1,1	46	7	0,6
	16	15	0,9	36	7	0,4	45	13	1,3
	17	7	0,7	37	6	0,5	44	14	1,0
	18	13	0,8	38	3	0,2	43	13	0,8
	19	12	1,1	39	13	1,0	42	20	1,0
Zusammen . . . .	315			242			289		
Mittlere Abschnitts-häufigkeit . . .	16,5			12,7			15,2		
Unsichere Brüche .	10			26			9		
Gesamt . . . . .	325			268			298		

Die Häufigkeit der euchromatischen Brüche, soweit sie in die 19 distalen Abschnitte aller langen Chromosomenschenkel und den distalen Abschnitt des Chromosoms 4 fallen, entspricht der Länge der betreffenden Chromosomen in den Speicheldrüsen (die Längenmessungen wurden unmittelbar an den Karten von BRIDGES vorgenommen). Tabelle 9 gibt die Verteilung der Brüche auf die einzelnen Chromosomen an. Die Werte, die auf Grund einer gleichmäßigen Bruchverteilung erwartet werden, stimmen mit den beobachteten trotz der Unstimmigkeit bei X und 2 R überein, wie die  $\chi^2$ -Methode zeigt.

Die Verteilung der Brüche auf die einzelnen Abschnitte der Chromosomen ist in Tabelle 10 angegeben. Hier ist neben der Zahl der beobachteten Brüche der Bruchkoeffizient aufgeführt. Dieser läßt sich entsprechend dem Crossing-over-Koeffizienten und dem Mutationskoeffizienten nach BRIDGES (MORGAN, BRIDGES, SCHULTZ, 1937) aus dem Verhältnis von regionaler Bruchhäufigkeit pro Längeneinheit des Einzelabschnittes zur Bruchhäufigkeit für die mittlere Längeneinheit des Gesamtchromosomenbestandes (des Euchromatins in diesem Falle) berechnen. Hier ist aber statt dessen, um die auf den Längenunterschieden beruhenden unterschiedlichen Bruchhäufigkeiten der einzelnen Chromo-

der euchromatischen Abschnitte.

3 L			3 R			4		
Ab-schnitte	Bruch-anzahl	Bruch-koeff.	Ab-schnitte	Bruch-anzahl	Bruch-koeff.	Ab-schnitte	Bruch-anzahl	Bruch-koeff.
61	32	2,0	100	19	1,5	102	18	1,0
62	20	1,2	99	18	1,2			
63	13	0,9	98	24	1,4			
64	21	1,1	97	16	1,0			
65	19	1,3	96	23	0,8			
66	20	0,8	95	22	1,1			
67	31	1,8	94	24	1,4			
68	16	1,2	93	22	1,2			
69	11	0,9	92	30	1,8			
70	17	1,1	91	13	0,7			
71	13	0,8	90	12	0,6			
72	7	0,5	89	21	1,1			
73	11	0,8	88	18	0,8			
74	4	0,3	87	29	1,2			
75	28	1,6	86	23	1,1			
76	11	0,9	85	17	0,6			
77	5	0,4	84	23	0,8			
78	3	0,3	83	18	0,9			
79	11	0,8	82	13	0,6			
293			385			18		
15,4			20,3			18,0		
10			9			—		
303			394			18		

somen auszugleichen, der durchschnittliche Bruchkoeffizient der einzelnen Chromosomen zugrunde gelegt worden.

Die Bruchkoeffizienten schwanken zwischen 0,2 und 2,8. Aus der Verteilung längs der Chromosomen läßt sich eine Regelmäßigkeit nicht ohne weiteres erkennen; nur zeigt sich, daß die distalen Enden vielfach hohe Koeffizienten haben. Dieses wird deutlicher in der graphischen Darstellung (Abb. 4), in der die jeweils 5 distalen Abschnitte der langen Chromosomenschenkel (1—5, 21—25, 55—60, 61—65, 96—100) schraffiert eingetragen sind. Die Abbildung zeigt klar, daß diese distalen Abschnitte im Mittel einen höheren Bruchkoeffizienten haben als die übrigen.

Da sich die verschiedenen Chromosomenschenkel wegen der ungleichen Länge der einzelnen Abschnitte nicht unmittelbar vergleichen lassen, wurde eine Umrechnung der Bruchwerte für 10 Abschnitte von je 10% der jeweiligen Schenkellänge vorgenommen. Die Bruchzahlen der Abschnitte, die dabei zerteilt wurden, wurden direkt proportional zur Länge der Teile umgerechnet. Außerdem wurden die nicht genau lokalisierten Brüche, die vorwiegend in die schwierig zu untersuchenden repeat-Regionen von Chromosom 2 L (Abschnitte 33—39) fallen, nach ihrer wahrscheinlichen Lage eingerechnet, wobei nur insgesamt 5 Brüche

nicht einbezogen werden konnten. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 11. Auch hier wurden die mittleren Bruchkoeffizienten der einzelnen Schenkel statt eines für alle Chromosomen berechnet. Wie aus der Tabelle hervorgeht, weist der distale Zehntelabschnitt des Euchromatins aller langen Chromosomen immer den höchsten Bruchkoeffizienten auf, während der

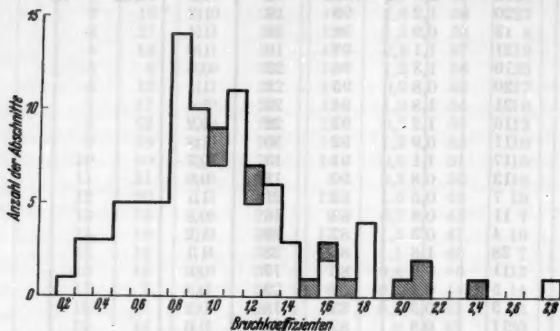


Abb. 4. Häufigkeit der Brüche in den Abschnitten der Chromosomen. Schraffiert die distalen 11 Unterabschnitte (je 2 der langen Schenkel, 1 des vierten Chromosoms).

niedrigste, außer beim X-Chromosom, in der proximalen Hälfte liegt. Ein genaueres Bild der regionalen Bruchverteilung gibt der Summenwert für alle Chromosomen (Tabelle 11, unterste Zeile), in denen sich die unregelmäßigen Schwankungen der Bruchkoeffizienten im Einzelchromosom weitgehend ausgleichen. Als Resultante bleibt eine Kurve

Tabelle 11. Bruchhäufigkeit von

Chromosomen		Ab-				
		distal				
		I	II	III	IV	V
X	Brüche	44,9	34,2	28,6	30,7	27,6
	Bruchkoeff.	1,38	1,05	0,79	0,94	0,85
2 L	Brüche	44,6	40,8	22,7	20,3	25,2
	Bruchkoeff.	1,68	1,54	0,86	0,77	0,95
2 R	Brüche	56,2	25,7	42,7	24,3	19,5
	Bruchkoeff.	1,90	0,87	1,44	0,82	0,66
3 L	Brüche	47,8	30,2	34,1	33,2	37,6
	Bruchkoeff.	1,58	1,00	1,13	1,10	1,24
3 R	Brüche	83,6	38,0	40,9	53,3	33,4
	Bruchkoeff.	13,6	0,96	1,04	1,35	0,85
Gesamt	Brüche	247,1	168,9	166,0	161,8	143,3
X—3 R	Bruchkoeff.	1,56	1,07	1,05	1,02	0,91

(Abb. 5), die von distal nach proximal abfällt und eine scharfe Krümmung im distalsten Bereich (Abschnitt 2) aufweist.

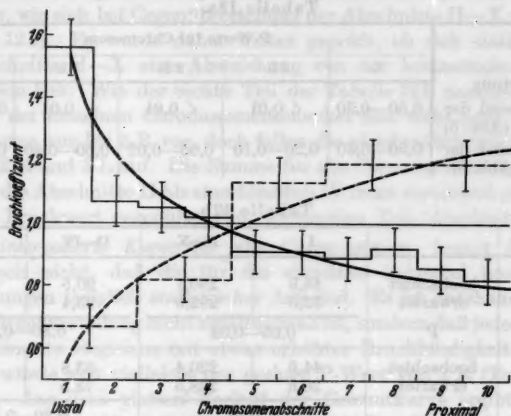


Abb. 5. Die Höhe der Bruchkoeffizienten längs den Chromosomen. Ausgezogene horizontale Linie gibt die für Bruchgleichheit geltende Grundlinie. Ausgezogen (—) die Kurve der Bruchkoeffizienten von *Drosophila melanogaster*; gestrichelt (---) die Kurve von *Tradescantia virginica* nach den Angaben von SAX und MATHER (vgl. S. 366).

Daß es sich um ein reales Phänomen handelt, zeigt die statistische Prüfung der Bruchhäufigkeit (Tabelle 12). Nach der  $\chi^2$ -Methode wurde zunächst geprüft, wie weit die Bruchverteilung auf die 10 Teil-

Zehntelabschnitten des Euchromatins.

schnitte					m	n	Nicht einbezogen
proximal							
VI	VII	VIII	IX	X			
37,5 1,15	30,9 0,95	28,5 0,88	32,5 1,00	32,6 1,00	32,5 1,00	325 —	— —
14,7 0,55	26,9 1,02	29,7 1,12	15,7 0,59	24,4 0,92	26,5 1,00	265 —	3 —
24,8 0,84	18,5 0,62	26,4 0,89	30,8 1,04	27,1 0,92	29,6 1,00	296 —	2 —
32,1 1,06	20,2 0,67	24,7 0,82	26,5 0,87	16,6 0,55	30,3 1,00	303 —	— —
35,7 0,91	43,9 1,11	36,1 0,92	30,4 0,77	25,7 0,73	39,4 1,00	394 —	— —
144,8 0,91	140,4 0,89	145,4 0,92	135,9 0,86	129,4 0,82	158,30 1,00	1583 —	5 —

Tabelle 12. Wahrscheinlichkeitswerte für Übereinstimmung der beobachteten mit der erwarteten Bruchverteilung.

Tabelle 12a.

Erwartung entsprechend der Geraden (Abb. 5) entsprechend der Kurve (Abb. 5)	P-Werte für Chromosom				
	X	2 L	2 R	3 L	3 R
	0,50—0,30	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,10—0,05
	0,50—0,30	0,20—0,10	0,05—0,02	0,50—0,40	0,30—0,25

Tabelle 12b.

Chromosom		I	II—X	II—IV	V—X
X	beobachtet	44,9	280,1	90,5	189,6
	erwartet	32,5	292,5	93,4	186,7
	P	0,05—0,02		0,80—0,70	
2 L	beobachtet	44,6	220,4	83,8	136,6
	erwartet	26,5	238,5	73,5	146,9
	P	< 0,01		0,20—0,10	
2 R	beobachtet	56,2	239,8	92,7	147,1
	erwartet	29,6	266,4	79,9	159,9
	P	< 0,01		0,10—0,05	
3 L	beobachtet	47,8	255,2	97,5	157,7
	erwartet	30,3	272,7	85,1	170,1
	P	< 0,01		0,10—0,05	
3 R	beobachtet	53,6	340,4	132,2	208,2
	erwartet	39,4	354,6	113,5	226,9
	P	0,02—0,01		0,05—0,02	
X—3 R	beobachtet	247,1	1335,9	496,7	839,2
	erwartet	158,3	1424,7	445,3	890,6
	P	< 0,01		< 0,01	

abschnitte einmal mit der Annahme einer gleichmäßigen Verteilung auf alle Chromosomenabschnitte, zum anderen, mit der in Abb. 5 eingetragenen ausgezogenen Kurve übereinstimmt. Aus der Tabelle 12a zeigt sich, daß mit der gleichmäßigen Verteilung nur das X-Chromosom und Chromosom 3 R noch übereinstimmen, während die Wahrscheinlichkeit für die anderen Schenkel kleiner als 0,01 ist. Dagegen entsprechen alle beobachteten Verteilungen der Verteilungskurve der Abb. 5. An der Grenze der Wahrscheinlichkeit liegt nur der Wert für Chromosom 2 R, doch ist auch bei diesem ebenso wie bei X und 3 R die Übereinstimmung besser als unter der Annahme einer gleichmäßigen Bruchverteilung.



Der Hauptanteil der Summen- $\chi^2$ -Werte (bei angenommener gleichmäßiger Verteilung) entfällt auf die hohen Abweichungen des ersten Abschnittes, wie sich bei Gegenüberstellung der Abschnitte II—X mit I zeigt (Tabelle 12b). Es wurde daher weiter geprüft, ob sich statistisch für die Abschnitte II—X eine Abweichung von der horizontalen Geraden nachweisen ließ. Wie der rechte Teil der Tabelle 12b anzeigt, liegt bei Prüfung der einzelnen Chromosomenschenkel eine wohl noch gesicherte Abweichung nur für 3 R vor, doch fallen die gleichmäßig tiefen P-Werte für 2 L, 2 R und 3 L auf. Die Summe für alle Chromosomen ergibt daher auch für die Abschnitte II bis einschließlich IV einen statistisch gesicherten höheren Bruchwert gegenüber dem proximalen Teil (Abschnitte V—X).

Die *interpolierte Kurve* für alle Chromosomen besagt nun allerdings noch nicht, daß die für die einzelnen Schenkel beobachteten Abweichungen lediglich statistischer Art sind. Es ist durchaus möglich, daß die Bruchverteilung nicht zufallsgemäß ist, sondern daß jedes Chromosom bestimmte Regionen mit etwas erhöhter Bruchhäufigkeit aufweist. Hieraus würde sich vielleicht der geringe P-Wert von 2 R (Tabelle 12a) erklären. Aus dem glatten Verlauf der Gesamtkurve ergibt sich bei Vorkommen von Abschnitten mit höherem Bruchkoeffizienten dann aber, daß diese möglichen Orte bevorzugter Brüche zufallsgemäß auf die Länge aller Chromosomen verteilt sind. Zu einer Prüfung dieser Möglichkeit ist die durchgeführte Analyse nicht ausreichend, es müßte dabei die Lokalisation in den Unterabschnitten festgestellt und eine wesentlich höhere Anzahl von Brüchen untersucht werden (vgl. S. 367).

## 2. Besprechung.

Als allgemeine Ergebnisse lassen sich für die Bruchverteilung folgende Sätze festlegen:

1. Die Verteilung der Brüche auf die einzelnen Chromosomen ist proportional zu deren Länge.
2. Die Bruchhäufigkeit des Heterochromatins, soweit sie beobachtbar war, entspricht der aus ihrer Metaphasenlänge zu erwartenden, wenn auch im einzelnen eine Analyse nicht durchführbar ist. Die Bruchhäufigkeit muß hier noch etwas höher sein, da die intraheterochromatischen Verlagerungen cytologisch nicht erfaßbar sind.
3. Die Brüche im Euchromatin sind regional verschieden häufig. Vom proximalen zum distalen Ende erfolgt eine allmähliche Zunahme, die nahe dem freien Ende plötzlich stark ansteigt.

Bei *Drosophila melanogaster* sind bisher Beobachtungen über die Bruchverteilung von PATTERSON, STONE, BEDICHEK und SUCHÉ (1934), von KAUFMANN und DEMEREC (1937), von BAUER, DEMEREC und KAUFMANN (1938) und von PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA (1939) sowie PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA und KHVOSTOVA (1939) mitgeteilt worden.

Die Befunde von PATTERSON und Mitarbeitern sind nach der genetischen  $F_2$ -Methode erhoben. Dadurch ist ein genauer Vergleich mit den hier gegebenen Zahlen nicht möglich. In Übereinstimmung mit diesen finden PATTERSON und Mitarbeiter höhere Bruchzahlen für die euchromatischen Endabschnitte und geringe für die proximalen Teile. Wenn auch in einigen Fällen, z. B. im X-Chromosom, 23 Brüche auf die Strecke  $sc-oc$  (0,0—21,1) entfallen gegenüber nur 9 in  $oc-f$  (56,7), so sind doch alle Zahlen zu klein, um einen noch größeren regionalen Unterschied, als hier angegeben, zu belegen. Die Untersuchung der spindelnahen Abschnitte ergab allerdings in den PATTERSONSchen Versuchen eine wesentlich höhere Bruchhäufigkeit als hier festgestellt werden konnte. So finden die amerikanischen Forscher im Chromosomenabschnitt rechts von  $f$  60% aller Brüche im X. Ebenso im zweiten zwischen  $pr$  und  $c$  fast 25% und im dritten Chromosom zwischen  $st$  und  $p$  nahezu 50% aller Brüche. Selbst wenn man berücksichtigt, daß durch die gewählten Genintervalle längere Euchromatinabschnitte noch mit einbezogen sind, würden die auf Grund der Metaphaselänge zu erwartenden Bruchhäufigkeiten doch noch zu niedrig bleiben (X etwa 45%, 2 etwa 22%, 3 etwa 18%). Die gegenüber der in den hier berichteten Versuchen höhere Bruchhäufigkeit im Heterochromatin muß auf die Rekombination zwischen nur heterochromatischen Brüchen zurückgeführt werden. Allerdings ist die (auf Grund der cytologisch festgestellten euheterochromatischen Verlagerungen zu berechnende) Häufigkeit für rein heterochromatische Verlagerungen, die sich für Zweierbrüche auf Grund der Formel  $e^2 + 2eh = 1$  ( $e^2$  = euchromatische,  $eh$  = euheterochromatische Verlagerungen) ergibt, immer noch niedriger als die von PATTERSON und Mitarbeitern gefundenen Werte. Jedoch ist die Gesamtzahl der lokalisierten Brüche zu niedrig, um eine genaue Prüfung möglich zu machen.

Gegenüber den von BAUER, DEMEREC und KAUFMANN mitgeteilten Ergebnissen über die Bruchverteilung ist hier eine genauere Feststellung der Bruchverteilung im Euchromatin gewonnen worden, während die Frage nach der Bruchverteilung des Heterochromatins, im besonderen nach der Häufigkeit in den einzelnen Chromosomen aus den angeführten methodischen Gründen offenbleiben muß. Für ihre Untersuchung sind besondere Wege (Verwendung von Verlagerungen) einzuschlagen.

Während sich die Befunde an *Drosophila* gut ergänzen, haben die Untersuchungen an pflanzlichem Material (*Crepis*: LEVITSKY und SIZOVA, 1935; *Tradescantia*: SAX, 1938; SAX und MATHER, 1939) ein genau gegenteiliges Bild der Bruchverteilung ergeben. Die Bruchbeteiligung der Chromosomenregionen nimmt von proximal nach distal ab. Die umfangreichsten Bestimmungen sind in der letztgenannten Arbeit angeführt. Bei Berechnung der Bruchkoeffizienten aus den angegebenen Werten ergibt sich die in der Abb. 5 eingetragene Kurve. Der Vergleich dieser

mit der bei den Speicheldrüsen gewonnenen Kurve zeigt, daß beide fast genau zur Linie der mittleren Bruchhäufigkeit spiegelbildlich symmetrisch verlaufen<sup>1</sup>.

Für die Bruchverteilung bei *Tradescantia* geben SAX sowie SAX und MATHER an, daß sie durch regional verschiedene Spiralisationsspannung bedingt sei. Nahe den Enden der Chromosomen sei Gelegenheit zur freien Abwicklung der Spiralen gegeben, während die spindel-fasernahen Abschnitte länger unter der Spannung gehalten würden. Diese Spannung wird als zusätzlicher mechanischer Faktor angesehen, der das Auftreten der induzierten Brüche erleichtert bzw. die Wiedervereinigung verhindert.

Die *Drosophila*-Ergebnisse lassen sich unter einer solchen Annahme nicht deuten. Aber auch eine andere Erklärung ist einstweilen nicht möglich. Bei der Konstitution des Spermienkopfes, in dem alle Chromosomen eine so feste Ordnung zeigen, daß alle nucleinsäurehaltigen Micellen eine gleichmäßige Ausrichtung erfahren haben (W. J. SCHMIDT, 1928; PATTERI, 1932), müssen alle Chromosomenabschnitte den gleichen mechanischen Bedingungen unterliegen. Wenn nur diese für die Bruchhäufigkeit entscheidend wären, sollte sie in allen Regionen gleich sein. Unterschiede wären nur etwa dann möglich, wenn die Rekombination erst nach Änderung dieser Bedingungen, also bei der Umwandlung in den männlichen Vorkern, erfolgen würde. Dann könnte die höhere Bruchhäufigkeit dadurch in Erscheinung treten, daß die abgetrennten Endabschnitte bei der Auflockerung des Chromosomenverbandes eine erhöhte freie Beweglichkeit zeigen, so daß sie seltener als die proximalen Teile eine Wiedervereinigung in der ursprünglichen Folge eingehen würden<sup>2</sup>. Ehe nicht größere Klarheit über das Rekombinationsgeschehen gewonnen ist, bleibt die Frage nach der Ursache der regionalen Bruchverschiedenheit besser offen (vgl. S. 382).

Bisher ist nur das allen Chromosomen gemeinsame Verhalten berücksichtigt worden. Die weitere Frage ist die, ob innerhalb jeden Chromosoms Abschnitte verschiedener Bruchhäufigkeit vorkommen. Für ihre Beantwortung reicht das zur Verfügung stehende Material nicht aus.

<sup>1</sup> Beide Kurven entsprechen auf logarithmischem Raster Geraden. Ob es sich aber tatsächlich um eine logarithmische Beziehung der Bruchverteilung handelt, ist ganz offen.

<sup>2</sup> Dr. KAUFMANN hat mir mündlich den Einwand gemacht, daß die hier angegebene Bruchkurve möglicherweise nur methodisch bedingt sei, da sie auf unterschiedlicher regionaler Dehnung der als Maßstab angenommenen BRIDGESschen Karten beruhen könne. Hiergegen spricht der regelmäßige Verlauf der Kurve, besonders die lange Strecke (das distale Fünftel) erhöhter Bruchhäufigkeit, weiter auch die Zählung der chromatischen Scheiben je Längeneinheit (vgl. BAUER, DEMERCO und KAUFMANN, Tabelle 5), durch die eine direkte Proportionalität von Scheibenzahl und Längeneinheit auch für die distalen Abschnitte nachgewiesen ist, so daß eine verschiedene Dehnung sehr unwahrscheinlich ist.

PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA ist aus der Untersuchung der Morphologie der X-Chromosomen von *D. melanogaster* zu der Auffassung gekommen, daß bestimmte Abschnitte, die sich durch ihre Neigung zur Paarung untereinander kennzeichnen, heterochromatischer Natur seien. Unter Verwendung vorliegenden Materials über die Bruchlokalisation findet sie (1939) dann, daß auch die diese angenommenen Heterochromatinabschnitte umfassenden Regionen erhöhte Bruchhäufigkeit zeigen. Eine statistische Prüfung fehlt bisher. Jedoch hat KAUFMANN (nach mündlicher Mitteilung) die Angaben von PROKOFIEVA wenigstens für einen Teil der angeführten Regionen bestätigen können, wenn auch statistisch die erhaltenen Werte der Brüche in den einzelnen BRIDGESSchen Unterabschnitten sich noch nicht sicher von der gleichmäßigen Verteilung unterscheiden lassen.

Selbst wenn dieses Vorkommen von Abschnitten erhöhter Bruchhäufigkeit schon jetzt als Tatsache anerkannt wird, so ergibt sich aus der Kurve für alle Chromosomen, daß solche interkalaren Heterochromatinabschnitte bei den einzelnen Chromosomen unregelmäßig über die Schenkel verteilt sind. Sonst würden sekundäre Gipfel auftreten. Diese kurzen Heterochromatinteile folgen also nicht der Regel der äquiloalen Heterochromatie (HEITZ, 1932).

Die Vorstellungen über die Bruchbeteiligung der beiden Chromatinarten ändern sich durch Anerkennung der Befunde von PROKOFIEVA-BELGOVSKAYA nicht: pro Längeneinheit im Speicheldrüsenchromosom ist Heterochromatin unabhängig von seiner Lage durch eine erhöhte Bruchhäufigkeit, Euchromatin durch eine geringere Bruchhäufigkeit gekennzeichnet. Regionale Beziehungen entscheiden über die Häufigkeit der realisierten Brüche. Diesen gegenüber muß die Häufigkeit der angelegten Brüche für alle Abschnitte mindestens so hoch sein, wie die der realisierten Brüche in den distalen. Ein erheblicher Teil muß also durch Wiedervereinigung in der ursprünglichen Anordnung verlorengehen.

## V. Die Bruchrekombination.

Wie oben schon ausgeführt wurde, sind in einem Kontaktpunkt 4—14 Bruchenden (von 2—7 Brüchen) untereinander neu kombiniert. Eine Untersuchung der sich beteiligenden Bruchstellen muß darüber Aufschluß geben, ob eine bestimmte Anordnung der Chromosomen im Spermakern vorliegt, die sich in der Bedingung bestimmter Arten von Verlagerungen äußern würde, oder ob die Frage der Chromosomenanordnung ohne Einfluß bleibt.

Eine Übersicht über das gesamte Material, nach Bruchzahl und Bruchart klassifiziert, gibt Tabelle 13. Für eine eingehendere Analyse sind nur die 2- und 3-Bruch-Kontaktpunkte geeignet; von den übrigen ist die Zahl der beobachteten Fälle nicht ausreichend.

Tabelle 13. Übersicht über die Rekombination der Brüche.

Anzahl der Brüche		Alle Brüche in den langen Chromosomen		1 Bruch im Chromosom 4	Fraglich	Gesamt
	aus Spermaten mit	alle Brüche im Euchromatin	1 bis mehrere Brüche im Heterochromatin			
2	1 Kontaktpunkt	241	156	21	1	419
	2-3 Kontaktpunkten	171	76	5	—	252
	gesamt	412	232	26	1	671
3	1 Kontaktpunkt	26	46	6	2	80
	2-3 Kontaktpunkten	22	21	—	—	43
	gesamt	48	67	6	2	121
4	1 Kontaktpunkt	4	11	4	9	28
	2-3 Kontaktpunkten	8	4	1	5	18
	gesamt	12	15	5	14	46
5 und mehr	1 Kontaktpunkt	1	4	—	3	8
	2-3 Kontaktpunkten	3	2	—	8	13
	gesamt	4	6	—	11	21
Zusammen		476	320	37	28	871

### 1. Der Abstand der Bruchpunkte.

a) *Balancierte Mutationen.* Wenn keine bevorzugte Kombination zwischen bestimmten Regionen eintritt, muß sich eine zufallsgemäße Beteiligung der Brüche ergeben. Diese Sachlage kann nach dem Vorgang von BAUER, DEMEREC und KAUFMANN derart geprüft werden, daß die Abstände der Brüche, die sich an einem Kontaktpunkt beteiligen, bestimmt werden. Als Abstandsmaß kann nach der Einteilung von BRIDGES die Zahl der Abschnitte genommen werden. Diese sind, wie betont, nicht längengleich. Jedoch muß sich bei der ganz regellosen Längenschwankung der so entstehende Meßfehler wieder ausgleichen.

Bei Inversionen ist der Bruchabstand einfach die Inversionslänge; bei Translokationen und komplizierten Verlagerungen wird der Abstand als Differenz der Abstände des distalen und proximalen Bruches vom Spindelansatz bzw. der ihm anliegenden heterochromatischen Abschnitte bestimmt. Eine reziproke Translokation mit Brüchen, z. B. bei 54 und 98, hat einen Bruchabstand von  $(98 - 81 = 18) - (54 - 41 = 13) = 4$  Einheiten.

Die Erwartungswerte für die Häufigkeit der einzelnen Abstandsklassen bei Zufallsverteilung aller Brüche ergeben sich aus folgenden Formeln:

Bei 2 Brüchen ist für den Abstand  $D_2 = 0$  die Häufigkeit  $p_0 = 1/k$ ; für die Abstände von 1 und mehr  $D_2 = i \geq 1$ ;  $p_i = \frac{2}{k^2} (k - i)$ .

Bei 3 Brüchen gelten die Formeln:  $D_3 = 0$ ;  $p_0 = 1/k^2$ ;  $D_3 = i \geq 1$   
 $p_1 = \frac{6}{k^3} i (k - i)$ , wobei  $D_3$  den Abstand der beiden am weitesten entfernten Brüche darstellt.

Diese Formeln gelten nur für euchromatische Verlagerungen, bei denen alle Brüche zufallsgemäß verteilt sein können;  $k$  stellt die Zahl der Längeneinheiten dar, in diesem Falle 19, die Anzahl der euchromatischen Abschnitte pro Chromosom.

Für euheterochromatische Verlagerungen, bei denen ein Bruch festgelegt ist, sind die entsprechenden Formeln (Verlagerungen mit dem Abstand 0 mit allen Brüchen im Heterochromatin sind cytologisch nicht erkennbar):

$$2 \text{ Brüche } D_{2H} = i; p_1 = \frac{1}{k-1}$$

$$3 \text{ Brüche } D_{3H} = i; p_1 = \frac{1}{(k-1)^2} (2i-1),$$

wobei in diesem Falle  $k = 20$ , der Anzahl aller Abschnitte jedes Chromosoms.

In den Formeln ist vorausgesetzt, daß die Bruchhäufigkeit im Mittel über die ganze Länge des Euchromatins gleich ist, was nach dem vorhergehenden Abschnitt nicht richtig ist. Ernstliche Abweichungen sind allerdings nur für die euheterochromatischen Verlagerungen zu erwarten.

In den Tabellen 14 und 15 sind die gefundenen und erwarteten Werte für euchromatische und euheterochromatische Verlagerungen

Tabelle 14. Abstände der Bruchpunkte in

Art der Mutation	n	Abstand in												
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Inversionen in Sp. mit 1 Ktpt.	76	3	10	8	7	3	7	5	7	3	8	1	1	2
	(74)	13		15		10		12		11		4		
	erw.	11,3		13,5		11,9		10,3		8,6		9,8		
Inversionen in Sp. mit 2—3 Ktpten.	54	—	4	8	4	7	4	4	6	3	1	1	1	1
	(51)	4		12		11		10		4		3		
	erw.	7,8		9,3		8,2		7,1		5,9		6,8		
Rez. Transloka- tionen aus Sp. mit 1 Ktpt.	160	15	13	10	10	11	7	9	15	10	4	6	10	6
	(143)	28		20		18		24		14		22		
	erw.	21,8		26,1		23,0		19,8		16,6		19,0		
Rez. Transloka- tionen aus Sp. mit 2—3 Ktpten.	107	3	11	14	12	12	4	8	6	7	2	3	3	5
	(98)	14		26		16		14		9		11		
	erw.	14,9		17,9		15,7		13,6		11,4		13,0		
Gesamt	397	21	38	40	33	33	22	26	34	23	15	11	15	14
	(366)	59		73		55		60		38		40		
	erw.	55,8		66,9		58,8		50,7		42,6		48,7		



mit 2 Brüchen zusammengestellt. Die euchromatischen 2-Bruch-Kontaktpunkte (Tabelle 14) haben einen mittleren Bruchabstand von  $6,06 \pm 0,23$  gegenüber einem erwarteten Wert von 6,32; es besteht weder im Gesamtmittelwert noch in denen der einzelnen Gruppen (Inversionen und reziproke Translokationen jeweils aus Spermien mit 1 oder mit 2 bis 3 Kontaktpunkten) ein gesicherter Unterschied von der Erwartung. Die Verteilung der einzelnen Abstandsklassen von 0 (beide Brüche im gleichen Abschnitt) bis 18 entspricht also der Erwartung. Es mußten zur Berechnung mehrere Abstandsklassen zusammengefaßt werden, um stets Erwartungswerte  $> 5$  zu erhalten; die sich nach dem  $\chi^2$ -Verfahren ergebenden P-Werte liegen sämtlich im Bereich zwischen 0,2 und 0,7, der für die Summen der Einzelserien zwischen 0,7 und 0,5, zeigen also keinerlei Abweichung von der Zufallserwartung. Das sich aus der Differenz der Summe der  $\chi^2$  der Einzelserien und dem  $\chi^2$  der Summenwerte ergebende  $\chi^2$  für Homogenität beträgt 18,896 ( $P = 0,5$  bis 0,3 bei 18 Freiheitsgraden), zeigt also die vollständige Vergleichbarkeit der Einzelreihen an. Bei euchromatischen 2-Bruch-Kontaktpunkten tritt also eine Rekombination zwischen zwei zufallsgemäß verteilten Brüchen ein.

Bei 2-Bruch-Kontaktpunkten (Tabelle 15) mit einem Bruch in einem heterochromatischen Abschnitt wurden, da sich infolge der Lokalisationsschwierigkeiten im Heterochromatin nicht immer zwischen Inversionen und reziproken Translokationen unterscheiden läßt alle

euchromatischen 2-Bruch-Kontaktpunkten ( $D_2$ ).

Abschnitten							M $\pm$ m	$\chi^2$	Frgr.	P
13	14	15	16	17	18	!				
3	2	2	2	—	—	—	5,99 $\pm$ 0,51			
9							—			
8,6							6,32	4,458	6	0,7—0,5
1	2	1	3	—	—	—	6,20 $\pm$ 0,61			
7							—			
5,9							6,32	7,716	6	0,3—0,2
7	2	1	4	1	2	—	6,31 $\pm$ 0,39			
17							—			
16,6							6,32	6,058	6	0,5—0,3
2	3	1	—	1	1	—	5,52 $\pm$ 0,42			
8							—			
11,4							6,32	5,466	6	0,5—0,3
13	9	5	9	2	3	—	6,06 $\pm$ 0,23			
41							—			
42,6							6,32	4,802	6	0,7—0,5

Tabelle 15. Abstände der Brüche in

	n	Abstand in											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Aus Sp. mit 1 Ktpt.	155	—	2	3	5	6	7	2	12	8	10	10	9
	(147)	5			18			22			29		
	erw.	23,21			23,21			23,21			23,21		
Aus Sp. mit 2—3 Ktpten.	76	—	4	2	4	3	2	4	2	8	6	5	5
	(75)	6			9			14			16		
	erw.	11,84			11,84			11,84			11,84		
Gesamt	231	—	6	5	9	9	9	6	14	16	16	15	14
	(222)	11			27			36			45		
	erw.	35,05			35,05			35,05			35,05		

Fälle nur nach ihrem Auftreten in 1- oder Mehr-Kontaktpunkt-Spermien getrennt. In beiden Gruppen zeigt sich, daß die mittlere Länge größer als nach der Erwartung ist. Dieses beruht auf einem Überschuß an Fällen mit großem und der Verringerung der Fälle mit kleinem Abstand. Da die Erwartungswerte für gleichmäßige Verteilung der euchromatischen Brüche berechnet sind, die Bruchhäufigkeit aber gegen das distale Ende hin zunimmt, müssen sich die beobachteten Werte ergeben. Allerdings entspricht der Anstieg der Abstandslängen nicht völlig der Bruchkurve, besonders die mittleren Abstandslängen sind etwas zu häufig. Ob sich hinter dieser kleinen Unstimmigkeit eine Gesetzmäßigkeit verbirgt, wird sich erst an größerem Material entscheiden lassen.

3-Bruch-Kontaktpunkte mit allen Brüchen im Euchromatin zeigen ebenfalls Zufallsverteilung ihrer Brüche. Diese läßt sich getrennt für die Gesamtlänge, also den Abstand der entferntesten beiden Brüche, sowie für die durch den zwischen ihnen liegenden mittleren Bruch bestimmten beiden Teilabschnitte nachprüfen. Im letzteren Fall gelten die Formeln

$$\text{für } d_3 = 0; \quad p_0 = \frac{3k-1}{2k^2} \text{ und}$$

$$\text{für } d_3 = i \geq 1; \quad p_i = \frac{3}{k^3} (k-i)^2.$$

In Tabelle 16 sind zunächst die Befunde über den Gesamtabstand zusammengestellt und mit den zu erwartenden Werten verglichen. Die Mittelwerte für die Fälle aus Spermien mit einem wie mit 2 bis 3 Kontaktpunkten sind von den erwarteten statistisch nicht verschieden. Auch die Verteilung stimmt mit der Erwartung überein (die fast völlige Gleichheit zwischen Beobachtung und Erwartung kommt durch die Zusammenfassung zu Sammelklassen zustande, wie sie zur Erzielung von Erwartungswerten von  $> 5$  notwendig ist; andere Klassenbegrenzung

euheterochromatischen 2-Bruch-Kontaktpunkten ( $D_{2H}$ ).

Abschnitten									$M \pm m$	$\chi^2$	Fgr.	P
13	14	15	16	17	18	19	1	1				
9	6	12	12	9	12	13	8	12,20 $\pm$ 0,40				
27			21		25		—					
23,21			15,47		15,47		—	10,00	25,322	6		< 0,01
2	5	2	4	1	9	7	1	11,33 $\pm$ 0,60				
9			5		16		—					
11,84			7,89		7,89		—	10,00	15,969	6		0,02—0,01
11	11	14	16	10	21	20	9	11,91 $\pm$ 0,33				
36			26		41		—					
35,05			23,37		23,37		—	10,00	27,308	6		< 0,01

gibt weniger gute, aber immer noch statistisch nicht abweichende Proportionen).

In Tabelle 17 sind die Werte für die Teilabschnitte angeführt. Auch aus ihr ist die Übereinstimmung zwischen Betrachtung und Erwartung sowohl für den Mittelwert der Abstände wie die Zerteilung der Klassen ersichtlich.

Die euheterochromatischen 3-Bruch-Kontaktpunkte schließlich lassen sich ebenfalls auf beide Weisen prüfen. Aus Tabelle 18 ergibt sich, daß der Mittelwert für den Gesamtstand etwas, aber statistisch nicht gesichert, höher liegt als erwartet. Es deutet sich also die gleiche, auf der höheren distalen Bruchhäufigkeit beruhende Erscheinung wie bei euheterochromatischen 2-Bruch-Verlagerungen an. Dasselbe ergibt sich aus der Verteilung der Längensklassen, doch ist auch hier bei einem P-Wert von 0,2—0,1 die Abweichung von der Zufallsverteilung der die Abstände ergebenden Brüche nicht gesichert. In Tabelle 19 und 20 endlich sind die Werte für den euchromatischen (zwischen den beiden distalen Brüchen) und dem euheterochromatischen Teilabschnitt zusammengefaßt, die sich aus den Formeln

$$d_{3E}) d = 0, p_0 = \frac{1}{k-1},$$

$$d = i \geq 1; p_i = \frac{1}{(k-1)^2} \cdot 2(k-1-i) \text{ und}$$

$$d_{3H}) p_i = \frac{1}{(k-1)^2} \cdot [2(k-1) - i]$$

ergeben. Es geht aus ihnen die weitgehende Übereinstimmung zwischen Beobachtung und Erwartung sowohl bei der Klassenverteilung wie dem Mittelwert hervor. Statistisch faßbare Unterschiede liegen nicht vor.

Damit ist für alle 2- und 3-Bruch-Kontaktpunkte nachgewiesen, daß die an ihnen beteiligten Brüche zufallsgemäß über die ganze Länge

Tabelle 16. Abstände der äußeren Bruchpunkte in euchromatischen 3-Bruch-Kontaktpunkten ( $D_3$ ).

Aus Sperrn mit	n	Abstand in Abschnitten																		M ± m	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		18
1 Ktpt. . .	22	—	—	—	—	5	1	2	1	—	2	2	3	1	1	—	—	1	1	1	1
2–3 Ktpten. .	21	—	—	—	—	1	1	3	3	—	2	1	3	1	1	2	—	1	2	—	—
Gesamt. . .	43	—	—	—	—	6	2	5	4	—	4	3	6	2	2	2	—	2	3	1	1
Beobachtet .	42	13																		8	—
Erwartet . .	42	12,49																		8,45	—
		8,57																		9,47	—

 $\chi^2 = 0,104$ ; Fgr. = 3;  $P > 0,99$ .Tabelle 17. Länge der beiden Teilabschnitte in euchromatischen 3-Bruch-Kontaktpunkten ( $d_3$ ).

	n	Abstand in Abschnitten																		M ± m	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		18
	50	2	7	8	2	4	8	5	4	2	1	2	—	1	1	—	—	—	1	—	2
Beobachtet	48	9	10	10	12	9	9	6,6	6,6	5	6,3	—	—	—	3	4,3	—	—	—	—	
Erwartet	48	10,5	11,4	8,8	8,8	8,8	8,8	6,6	6,6	5	6,3	—	—	—	3	4,3	—	—	—	—	

 $\chi^2 = 3,132$ ; Fgr. = 5;  $P = 0,7-0,5$ .Tabelle 18. Abstände der äußeren Bruchpunkte in euheterochromatischen 3-Bruch-Kontaktpunkten ( $D_{H3}$ ).

Aus Sperrn mit	n	Abstand in Abschnitten																			M ± m			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		?		
1 Ktpt.	44	—	—	—	—	1	3	1	1	1	—	3	3	—	5	9	1	8	4	4	—	14,11 ± 0,59		
2-3 Ktpten.	17	—	—	—	—	2	1	—	—	1	—	1	3	1	1	1	1	—	2	3	—	13,12 ± 1,13		
Gesamt	61	—	—	—	—	3	4	1	1	2	—	4	6	1	6	10	2	8	6	7	—	13,84 ± 0,53		
Beobachtet	61	7																			33	—		
Erwartet	61	6,08																			10,81	16,22	27,88	—

 $\chi^2 = 5,407$ ; Fgr. = 3;  $P = 0,2-0,1$ .

Tabelle 19.

Länge des euchromatischen Teilabschnittes in euheterochromatischen 3-Bruch-Kontaktpunkten ( $d_{E3}$ ).

	n	Abstand in Abschnitten																		M ± m	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		18
	62	2	5	7	7	6	3	6	2	6	—	4	2	2	—	5	1	1	1	—	2
Beobachtet	60	7	14	10,97	9	8	8	6	—	8	7,98	8	8	6,98	—	—	—	—	—	—	—
Erwartet	60	9,14	10,97	9,64	8,31	6,98	7,98	6,98	8,31	6,98	7,98	8	8	6,98	—	—	—	—	—	—	—

$\chi^2 = 1,680$ ; Frgr. = 6; P = 0,95—0,90.

Tabelle 20.

Länge des euheterochromatischen Teilabschnittes in euheterochromatischen 3-Bruch-Kontaktpunkten ( $d_{H3}$ ).

	n	Abstand in Abschnitten																			M ± m
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
	62	7	4	3	5	7	4	2	2	5	2	6	3	2	2	2	3	1	—	—	2
Beobachtet	60	11	8	11	11	11	11	4	7	6,65	7,48	11	11	8	5,82	—	—	—	—	—	7,48 ± 1,91
Erwartet	60	11,97	10,64	9,31	7,98	6,65	7,48	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6,84

$\chi^2 = 5,502$ ; Frgr. = 6; P = 0,5—0,3.

der Chromosomenschenkel verteilt sind; die höhere Bruchhäufigkeit der distalen Abschnitte äußert sich in einer gegenüber der Zufallsverteilung etwas größeren Häufigkeit der hohen Längsklassen bei euheterochromatischen Verlagerungen.

Tabelle 21.

Lage der Brüche bei Inversionen und reziproken Translokationen.

Art der Mutationen	Ein Bruch im distalen Abschnitt		Beide Brüche nicht im distalen Abschnitt	Unbe- stimmt	n
	im distalen Unterabschnitt	nicht im distalen Unterabschnitt			
Inversionen . . .	6	18	101	5	130
Translokationen . .	2	32	216	16	266
Gesamt	8	50	317	21	396

Einer Teilfrage sei noch nachgegangen. Es ist früher angenommen worden, daß Verlagerungen auch nach einfachem Bruch auftreten können (terminale Inversionen und Translokationen). Ihr Vorkommen würde bedingen, daß die Bruchhäufigkeit des distalsten Unterabschnittes scheinbar erhöht ist. Sie wurde geprüft, indem die Lage des distalen Bruches bei Inversionen und reziproken Translokationen in den Unterabschnitten (A—F) des distalen Abschnittes festgestellt wurde. Die sich ergebenden Anzahlen sind in der Tabelle 21 enthalten. Aus ihr zeigt sich, daß im distalsten Unterabschnitt des Chromosomen 8 von 58 Brüchen auftreten. Bei gleicher Bruchhäufigkeit im distalen Abschnitt sollte die Bruchanzahl je Unterabschnitt 9,7 betragen. Der beobachtete Wert ist noch niedriger, obwohl er bei dem Verlauf der allgemeinen Bruchkurve sogar den Betrag 9,7 noch übersteigen sollte. Es liegt also gar kein Anzeichen dafür vor, daß 1-Bruch-Verlagerungen auftreten. Selbst Inversionen und Translokationen, bei denen ein distaler Bruch scheinbar fehlt, müssen als 2-Bruch-Fälle, bei denen der distale Bruch so dicht am freien Ende liegt, daß er durch die mikroskopische Untersuchung nicht erkannt werden kann (BAUER, 1937), gedeutet werden.

b) *Deficiencies und Duplikationen.* Bei den nicht balancierten Mutationen liegt ein bereits selektionsiertes Material vor, da infolge Störung des genischen Gleichgewichtes nur ein geringer Teil der aufgetretenen Fälle bis zur Beobachtung lebensfähig bleibt. Da hier die Larven untersucht werden, ist wahrscheinlich, daß ein Teil der gefundenen Chromosomenmutationen noch während der Metamorphosevorgänge ausgefallen wäre. Die Anzahl der aufgefundenen Deficiencies und Duplikationen ist sehr niedrig; unter 688 mutierten Spermien fanden sich nur 13 mit Deficiencies und 7 mit Duplikationen, von denen die eine mit einer sehr kurzen Deficiency kombiniert sein muß (scheinbar



terminale Duplikation nach reziproker Translokation). Es ist allerdings zu berücksichtigen, daß nach der gewählten Methode die sehr kleinen Stückausfälle wohl häufiger nicht erkannt worden sind. Von den 13 Deficiencies traten 9 als euchromatische 2-Bruch-Kontaktpunkte, 1 als euheterochromatischer auf, während 3 in euchromatischen 3-Bruch-Kontaktpunkten der Bruchverteilung 2,1 bzw. 3 vorkamen. Die Länge des Ausfalls betrug von 1—19 Unterabschnitten (bis über 100 Querscheiben). Es lagen also auch beträchtlich lange Ausfälle vor.

Unter den 7 Duplikationen traten teilweise sehr komplizierte Fälle auf mit gleichzeitiger Verdoppelung nichtbenachbarter Abschnitte. Sie sollen in einer späteren Arbeit getrennt behandelt werden. Die cytologische Länge ist, entsprechend der bekannten Tatsache, daß Duplikationen weniger störend sind als Ausfälle, größer als bei diesen; es wurden verdoppelte Strecken von 6—42 Unterabschnitten beobachtet, wobei in dem Fall der zweitlängsten Duplikation (70 C—77 CD) noch eine weitere Duplikation für den Abschnitt 57 EF—59 DE vorlag. Die längsten Duplikationen umfassen über 200 Querscheiben.

## 2. Die Beteiligung der Chromosomenschenkel.

Wie von BAUER, DEMEREC und KAUFMANN ausgeführt wurde, sollten bei ganz freier Kombination von zufallsgemäß auf die einzelnen Schenkel verteilten Brüchen die angelegten Chromosomenmutationen den Klassen des Polynoms  $(a + b + \dots)^n$  entsprechen, wobei  $a, b, \dots$  die Anzahl der Chromosomenschenkel, der Exponent  $n$  die Anzahl der aufgetretenen Brüche darstellt. Zur Vereinfachung der Berechnung wird das sehr kurze 4. Chromosom außer Betracht gelassen, und die 5 langen Schenkel können als gleich lang behandelt werden. Es würden dann folgende Verhältnisse angelegter Chromosomenmutationen je Kontaktpunkt erwartet werden (es bedeuten: 1,1 = beide Brüche in verschiedenen Schenkeln, 2 = beide Brüche in gleichen Schenkeln, 1,1,1 = 3 Brüche je in einem Schenkel, 2,1 = 3 Brüche, davon 2 in einem, 1 in einem anderen Schenkel usw.):

- 2 Brüche ergeben die Fälle 1,1:2 im Verhältnis 4:1,
- 3 " " " " 1,1,1:2,1:3 im Verhältnis 12:12:1,
- 4 " " " " 1,1,1,1:2,1,1:3,1:2,2:4 im Verhältnis 24:72:16:12:1.

Die Zahlenverhältnisse gelten für die angelegten Chromosomenmutationen. Die einzelnen Verteilungstypen unterscheiden sich in dem Prozentsatz der bizentrischen oder Deficiencies aufweisenden Kombinationen, die um so häufiger sind, je mehr Schenkel sich beteiligen. Bei 2 Brüchen ist bei 1,1- und 2-Fällen die Letalität gleich. Die lebensfähigen Mutationen (reziproke Translokationen und Inversionen) werden also ebenfalls im Verhältnis 4:1 erwartet.

Bei 3 Brüchen ergeben die 1,1,1-Fälle dagegen weniger häufig lebensfähige Mutationen als die anderen Verteilungstypen<sup>1</sup>. Von den 15 Kombinationsmöglichkeiten der 6 Bruchenden kommen bei der Verteilung 1,1,1 2, bei 2,1 und 3 je 4 Fälle vor, die monozentrische Chromosomen ohne Deficiencies darstellen und bei denen keine Wiedervereinigung der Enden eines oder aller Brüche stattgefunden hat. Es ist also ein Verhältnis der überlebenden Mutationen der Bruchverteilung 1,1,1:2,1:3 von 6:12:1 zu erwarten.

Noch komplizierter liegt die Sache bei 4 Brüchen. Hier sind 105 Kombinationsmöglichkeiten gegeben, von denen bei 1,1,1,1 9, bei 2,1,1 17 und bei den anderen Verteilungstypen je 25 lebensfähig sind. In jeder Gruppe treten weiter aber 3 Fälle auf, bei denen je 2 Brüche paarweise eine Neukombination eingegangen sind, die also von Fällen mit 2 Kontaktpunkten nicht zu unterscheiden sind. Es bleiben also bei 1,1,1,1 6, bei 2,1,1 14 und bei den anderen Verteilungsarten je 22 Rekombinationen übrig. Statt des Verhältnisses der angelegten 4-Bruch-Mutationen treten also die beobachtbaren Fälle von 1,1,1,1:2,1,1:3,1:2,2:4 im Verhältnis 6,55:45,82:16:12:1 auf.

Tabelle 22.

Zahlenverhältnis von euchromatischen 2-Bruch-Kontaktpunkten.

Bei Rekombination zwischen n-Schenkeln		Bruchverteilung		P
		1,1 (T)	2 (In)	
n =	beobachtet	$\frac{160 + 107}{267}$	$\frac{76 + 56}{132}$	
3	erwartet	266	133	0,9—0,8
4	erwartet	299,25	99,75	< 0,001
5	erwartet	319,20	79,80	< 0,001

Zur Prüfung der Frage, ob diese Zufallsverteilungen vorliegen, sind nur die euchromatischen Verlagerungen brauchbar. In der Tabelle 22 sind die Zahlen für 2-Bruch-Fälle zusammengestellt. In jedem Feld (das gilt auch für die folgenden Tabellen) sind in der oberen Reihe links die Anzahlen aus Spermien mit 1 Kontaktpunkt, rechts die aus Spermien mit 2—3 Kontaktpunkten getrennt aufgeführt. Die Summen aller Fälle verhalten sich fast genau wie 2:1.

Dieses Verhältnis ist sowohl von 4:1 wie von 3:1 gesichert verschieden (die P-Werte der Tabellen sind nach der  $\chi^2$ -Methode berechnet). Das Verhältnis 2:1 entspricht einer zufallsgemäßen Verteilung, wenn nur 3 Schenkel sich beteiligen, das von 3:1 einer Beteiligung von 4 Schenkeln.

Die Abweichung vom Verhältnis 4:1 zeigt, daß eine unbeschränkte Rekombination nicht möglich ist. Aus dem beobachteten Verhältnis kann der Schluß gezogen werden (BAUER, 1939a), daß eine Anordnung

<sup>1</sup> Dieses ist in der Tabelle 7 bei BAUER, DEMERCO und KAUFMANN übersehen worden.

der Chromosomen im Spermium auftritt, bei der im Mittel in jedem Rekombinationsbereich nur 3 Chromosomenschenkel zusammenliegen. Daß eine derartige Anordnung nicht für die Fälle von höherer Bruchzahl maßgebend ist, zeigt die Prüfung der 3- und 4-Bruch-Fälle. Bei ersteren sollte nämlich ein Verhältnis 1:6:1 der 3 Verteilungsmöglichkeiten auftreten. Tabelle 23 zeigt jedoch, daß die beobachteten Anzahlen gesichert von dieser Erwartung abweichen. Sie entsprechen dagegen sowohl der Beteiligung von 4 wie von 5 Schenkeln. Eine genaue Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten erfordert ein größeres Material (die P-Werte sind nur Annäherungen, da eine Erwartungsklasse unter 5 liegt, für  $n=5$  ist P nur für die 2 Klassen 1,1,1 und 2,1 + 3 berechnet worden). Für 4-Bruch-Kontaktpunkte (Tabelle 24) schließlich zeigen die nur 10 Fälle eine vollständige Übereinstimmung mit der Erwartung unter der Voraussetzung der Beteiligung von 5 Schenkeln.

Tabelle 23.

Zahlenverhältnis von euchromatischen 3-Bruch-Kontaktpunkten.

Bei Rekombination zwischen n-Schenkeln		Bruchverteilung			P
		1,1,1	2,1	3	
n =	beobachtet	6 + 8 14	13 + 12 25	2 + 3 5	
3	erwartet	5,50	33,00	5,50	< 0,001
4	erwartet	10,15	30,46	3,39	0,3 — 0,2
5	erwartet	13,89	27,79	2,32	(0,95 — 0,90)

Tabelle 24.

Zahlenverhältnis von euchromatischen 4-Bruch-Kontaktpunkten.

	Bruchverteilung				
	1,1,1,1	2,1,1	3,1	2,2	4
Beobachtet . . . .	1	7	2	1	—
Erwartet (5) . . . .	0,80	5,63	1,96	1,47	0,12

Nur für Inversionen und Translokationen ist weiter das Material groß genug, um die Beteiligung der einzelnen Chromosomenschenkel an den Verlagerungen zu prüfen. In der Tabelle 25 sind die einzelnen Werte zusammengestellt. Die Häufigkeit der Inversionen liegt zwischen 16 und 38, die der reziproken Translokationen zwischen 22 und 34. Da sich die Längenunterschiede der einzelnen Chromosomenschenkel in diesen Zahlen ausdrücken, müssen sie bei der Berechnung der Erwartungswerte in Rechnung gestellt werden. In dem Polynom  $(a + b + c + d + e)^2$  sind für a, b . . . e die Längenwerte der Chromosomenschenkel einzusetzen, die nach den Speicheldrüsenkarten etwa für X 18,7%, für 2 L 17,8%, 2 R 20,1%, 3 L 18,3% und 3 R 23,7% der Längensumme aller Chromosomen beträgt. Weiter ist zu berücksichtigen, daß die Inversionen doppelt so häufig sind, wie bei Zufallsbeteiligung der Schenkel erwartet wird.

Die sich ergebenden theoretischen Zahlen stimmen, wie die beigefügten P-Werte zeigen, mit den beobachteten gut überein. Translokationen zwischen den beiden Schenkeln eines Autosoms (sog. dyscentrische Inversionen) fügen sich in ihrem Verhalten völlig den interchromosomalen Translokationen ein.

Tabelle 25. Beteiligung der einzelnen Chromosomenschenkel an Inversionen und reziproken Translokationen.

Inversionen	in	X	2 L	2 R	3 L	3 R	$\chi^2 = 3,086$ , Frgr. = 4 P = 0,7—0,5
	beob.	17 + 12	7 + 9	13 + 11	18 + 6	21 + 17	
	erw.	29	16	24	24	38	
Rezi- proke Trans- loka- tionen	zwischen	X—2L	X—2R	X—3L	X—3R	2L—2R	$\chi^2 = 4,832$ , Frgr. = 9, P = 0,95—0,90
	beob.	18 + 7	16 + 9	18 + 10	16 + 11	15 + 9	
	erw.	25	25	28	27	24	
	erw.	22,83	25,79	23,48	30,40	24,54	
	zwischen	2L—3L	2L—3R	2R—3L	2R—3R	3L—3R	
	beob.	13 + 7	17 + 17	14 + 12	17 + 18	16 + 6	
	erw.	20	34	26	35	22	
	erw.	22,35	28,94	25,23	32,68	29,75	

Tabelle 26. Kombination von Inversionen und Translokationen in Spermien mit zwei Kontaktpunkten.

Kombination		Verteilung der Brüche auf die Chromosomen					Gesamt	
		1,1,1,1	2,1,1	3,1	2,2	4	beob.	erw.
2 Inversionen	beob.	—	—	—	4	1	5	
	erw.	—	—	—	2,6	0,6		3,2
Inversion + Translokation	beob.	—	8	5	—	—	13	
	erw.	—	7,7	5,2	—	—		12,9
2 Transloka- tionen	beob.	3	7	—	1	—	11	
	erw.	3,9	7,7	—	1,3	—		12,9
Gesamt	beob.	3	15	5	5	1	29	
	erw.	3,9	15,4	5,2	3,9	0,6		29,0

Für die Untersuchung der Kombination von 2 Kontaktpunkten steht auch nur ein geringes Material in den Fällen mit 4 euchromatischen Brüchen zur Verfügung. Unter 29 beobachteten Fällen liegen 5 mit Paaren von Inversionen vor; 13 sind Kombinationen von Inversionen und Translokationen und 11 schließlich Paare von Translokationen. Diese drei Kombinationsmöglichkeiten sollten im Verhältnis  $(1+2)^3 = 1:4:4$  auftreten, womit die Beobachtung auch übereinstimmt. Die sich aus der zufallsgemäßen Verteilung auf die Chromosomen ergebenden Lagemöglichkeiten sind in der Tabelle 26 zusammengestellt.

In allen Klassen entspricht die beobachtete Anzahl weitgehend der bei vollständiger Zufallsbeteiligung der Chromosomen erwarteten.

### 3. Besprechung.

In den vorstehenden Abschnitten sind zwei scheinbar gegensätzliche Befunde erhoben worden. Erstens sind die sich an einer Verlagerung beteiligenden Bruchstellen zufallsgemäß längs den Chromosomen verteilt. Zweitens aber liegt bei 2-Bruch-Mutationen eine nicht-zufallsgemäße Beteiligung der Chromosomenschenkel vor.

Beide Erscheinungen lassen sich aber folgendermaßen verstehen. Zwei verschiedene Faktoren bestimmen die Bruchkombination: einmal die Anordnung der Chromosomen im Spermienkopf, zum anderen die Beweglichkeit der Bruchstellen vor der vollzogenen Rekombination. Die Tatsache, daß Inversionen gegenüber der Zufallserwartung zu häufig sind, kann nur so gedeutet werden, daß die Rekombinationsfreiheit eingeschränkt ist auf Bereiche, die durch nur 3 Chromosomenschenkel gekennzeichnet sind. Wenn also die Rekombination nicht frei ist, so muß der zufallsgemäße Bruchabstand auf der Anordnung der Chromosomen beruhen, die also ebenfalls zufallsgemäß sein muß. Andernfalls, etwa bei einer Parallelorientierung aller Schenkel im Spermienkopf nach der Art eines strengen terminalen Polfeldes, müßten auch die Bruchabstände nichtzufallsgemäß sein.

Normalerweise ist es nicht möglich, irgendeine Aussage über die Chromosomenlage im Spermienkopf zu machen. In einem Ausnahmefall, bei *Dicranomyia trinitata*, aber ließ sich nachweisen (WOLF, 1939), daß die Chromosomen zwar in einem Polfeld orientiert auftreten, daß aber dieses Polfeld in der Kernmitte liegt. Eine derartige Lagerung der Chromosomen gleicht weitgehend einer zufälligen Anordnung, da die Spindelansätze nicht beieinander gehalten werden, da weiter die Orientierung des Polfeldes zur Kernachse nicht festliegt und schließlich die freien Schenkel eine Vielzahl von Lagemöglichkeiten haben. Durch diese Variablen wird eine Anordnung der Chromosomen erreicht, und mit der endgültigen Ausbildung des fadenförmigen Spermienkopfes festgehalten, bei der alle Chromosomenabschnitte eine zufallsgemäße Lagebeziehung zueinander erhalten.

Wenn auch die Beobachtungen an *Dicranomyia* bisher die einzigen ihrer Art sind, so sind sie doch an einer Spermienform von typischem Geißelbau erhoben, bei einer Art zudem, die zur gleichen Ordnung wie *Drosophila* gehört. Es spricht jedenfalls keine Beobachtung gegen die Annahme, daß die zufallsgemäße Anordnung der Chromosomen die Grundlage für die zufallsgemäße Entfernung der Bruchpunkte darstellt.

Die nichtzufallsgemäße Beteiligung der Chromosomenschenkel bei euchromatischen 2-Bruch-Kontaktpunkten andererseits zeigt, daß die Rekombination eingeschränkt ist. Die Übereinstimmung des beobachteten mit dem bei Beteiligung von 3 Schenkeln erwarteten

2:1-Verhältnis für Translokationen und Inversionen nötigt weiterhin zu dem Schluß, daß der Rekombinationsbereich räumlich einem Kernbezirk entspricht, der durch enge Nachbarschaft von nur 3 Chromosomenschenkeln bestimmt wird. Daß andererseits dieser Rekombinationsbereich nicht stationär festgelegt ist, zeigen die Kontaktpunkte mit 3 und 4 Brüchen. Bei diesen entspricht das beobachtete Verhältnis dem bei Beteiligung von 4 oder 5, bzw. 5 Schenkeln erwarteten. Mit weiteren Brüchen wächst also der Rekombinationsbereich. Über seine wirkliche Größe kann nichts Genaues ausgesagt werden, jedoch lassen sich unter einer Reihe von nur bedingt richtigen Annahmen wenigstens einige Aussagen über die relative Größe dieses Bereiches machen.

Die Grundlage hierzu bieten die Spermien mit 4 euchromatischen Brüchen. Diese können einen oder zwei Kontaktpunkte bilden. Von ersteren wurden 3, von letzteren 29 Fälle beobachtet. Macht man die Grenzannahme, daß alle 4 Brüche im Spermium sich miteinander vereinigen, so wird ein Verhältnis der überlebenden Mutationen mit einem oder zwei Kontaktpunkten von 1:0,2 erwartet, während das beobachtete Verhältnis 1:9,7 beträgt. Hierin liegt ein weiterer Beweis für die Rekombinationsbeschränkung. Das erwartete Verhältnis hängt dabei vom Grad der Rekombinationsfreiheit ab, von deren Ausmaß folgendermaßen ein Bild gewonnen werden kann: Die Spermienköpfe sind fadenförmig und haben nach Messungen an fixiertem Material eine Länge von rund  $7\mu$  und einen Durchmesser von etwa  $0,35\mu$  (GOWEN und GAY, 1933). Als Rekombinationsbereiche kann man also ohne zu großen Fehler einfach Querabschnitte des Spermienkopfes annehmen. Es seien weiter zur Vereinfachung die Annahmen gemacht, daß die Rekombinationsbereiche vollständig voneinander gesondert sind, und daß alle in einen Bereich entfallenden Brüche sich sämtlich untereinander rekombinieren (für beides muß in Wirklichkeit natürlich lediglich der Bruchabstand als modale Rekombinationsstrecke entscheidend sein):

Bei zufälliger Verteilung von 4 Brüchen in  $k$  Rekombinationsbereichen ergeben sich die Häufigkeiten für 4 angelegte Brüche im gleichen und für je 2 angelegte Brüche in zwei verschiedenen Rekombinationsbereichen aus der Formel  $(a + b + \dots + k)^4$ . Bei der Berechnung der beobachtbaren Fälle ist dann weiter der Prozentsatz der letalen und der unvollständigen Rekombinationen (mit Wiedervereinigung zusammengehöriger Bruchstellen) zu berücksichtigen. Bei 4 Brüchen im Bereich lassen sich nur 13,6% als lebensfähige 4-Bruch-Kontaktpunkte erhalten, während 2,8% als Paare von 2-Bruch-Kontaktpunkten erscheinen; die übrigen 83,6% geben einen kleinen Teil von einzelnen 3- und 2-Bruch-Kontaktpunkten, während der größere zygotisch letal ist (bei der Prozentberechnung ist freie Bruchverteilung auf 5 Schenkel angenommen, wie sie nach Tabelle 24 für 4-Bruch-Kontaktpunkte gilt). Ein Paar Kontaktpunkte in verschiedenen Bereichen ergibt in 11,1% aller Fälle lebensfähige 4-Bruch-Spermien.



Unter diesen Voraussetzungen ist für eine Reihe von Anzahlen von Rekombinationsbereichen das zu erwartende Verhältnis von 4-Bruch-Kontaktpunkten zu Paaren von 2-Bruch-Kontaktpunkten bei 4 im Spermium angelegten Brüchen in der Tabelle 27 zusammengestellt. Das vorliegende Material mit der Proportion 1:9,7 würde am besten dem Fall von 5 Rekombinationsbereichen entsprechen. Es ist jedoch nicht möglich, durch einen Vergleich der Anzahl von Spermien mit einem 4-Bruch-Kontaktpunkt mit der von Spermien mit zwei 2-Bruch-Kontaktpunkten zu einer Entscheidung zu gelangen, da sich ähnliche Zahlenverhältnisse auch bei höherer Bruchzahl und entsprechend höherer

Tabelle 27.

Anzahl der Rekombinationsbereiche	Anzahl der Kombinationsmöglichkeiten	Angelegte Kontaktpunkte		Überlebensverhältnis beider Mutationstypen	Entsprechendes Verhältnis der überlebenden 3- und 2-Bruch-Typen
		1 mit 4 Brüchen	2 mit je 2 Brüchen		
1	1	1	—	1 : 0,2	: 0,9 : 0,4
2	16	2	6	1 : 2,7	: 6,9 : 11,4
3	81	3	18	1 : 5,2	: 12,9 : 52,4
5	625	5	60	1 : 10,2	: 24,9 : 224,4
10	10000	10	270	1 : 22,7	: 54,9 : 1179,4
20	160000	20	1140	1 : 47,7	: 114,9 : 5339,4
k	k <sup>4</sup>	k	3k (k — 1)		

Anzahl von Rekombinationsbereichen ergeben, wie sich auf Grund entsprechender Polynome berechnen läßt. So ist das Verhältnis der beiden Mutationsarten bei 6 Brüchen und 6 Rekombinationsbereichen 1:9,1, kommt also dem bei 4 Brüchen und 4—5 Rekombinationsbereichen nahe. Dieselbe Proportion 1:9,1 ergibt sich aber auch bei 12 Brüchen und 10 Rekombinationsbereichen. Aus dem Verhältnis der 4:2+2-Bruchfälle läßt sich also nur auf eine allgemeine Übereinstimmung zwischen den Anzahlen der Brüche und der Bereiche schließen.

Wird dagegen auch die Häufigkeit der 3- und 2-Bruch-Fälle berücksichtigt, so ergeben sich eindeutigere Proportionen. Das beobachtete Verhältnis der 4:2+2:3:2-Bruchfälle ist für euchromatische Verlagerungen 1:9,7:7,0:78,7, für alle Verlagerungen 1:4,0:4,1:20,5. Diese Proportionen kommen berechneten für 6—8 Brüche im Spermium mit 6—8 Rekombinationsbereichen nahe. Für 7 Brüche und 6 Rekombinationsbereiche z. B. beträgt die theoretische Proportion 1:8,6:5,6:21,2. Allgemein zeigen solche Berechnungen, daß mit steigender Bruchzahl die Häufigkeit der 3-Bruch-Fälle gegenüber der der 2+2-Bruchfälle abnimmt, sich aus deren Proportion also die ungefähre Bruchzahl ergibt. Die 2-Bruch-Fälle erlauben dann die ungefähre Bestimmung der Anzahl der Rekombinationsbereiche. Diese muß also klein, von der Größenordnung 10 sein.

Es ist schon betont worden, daß es sich hier nur um eine erste Annäherung handelt, da die Bruchzahl natürlich einer Poisson-Verteilung

folgt und die Fälle mit höheren Bruchzahlen ihrerseits wieder zu einem Teil 4-Bruch-Kontaktpunkte liefern, während die mit niedrigeren nichts beitragen können. Außerdem ändert auch die fehlende Abgrenzung zwischen den Rekombinationsbereichen das angegebene Verhältnis der verschiedenen Bruchtypen. An der größenordnungsmäßigen Annäherung der angegebenen an die wirklichen Verhältnisse wird aber, soweit ersichtlich, nicht viel geändert. Auf keinen Fall ist es möglich, daß entsprechend der Kontakthypothese die Rekombination zwischen eng benachbart liegenden Brüchen erfolgt, da hierzu eine Anzahl von Rekombinationsbereichen (und angelegten Brüchen) erforderlich wäre, die um 2—3 Größenordnungen höher als die hier geschätzte liegt. (Genauere Berechnungen sollen erst durchgeführt werden, wenn im Zusammenhang mit anderen Versuchen das Beobachtungsmaterial vermehrt worden ist.) Es muß noch darauf hingewiesen werden, daß dann, wenn neben der räumlichen eine zeitliche Rekombinationsbeschränkung vorliegt, die Anzahl der angenommenen Rekombinationsbereiche entsprechend geringer anzusetzen ist.

Außer den entsprechenden Beobachtungen von BAUER, DEMEREC und KAUFMANN sowie von CATCHESIDE (1938a) an *Drosophila melanogaster* liegen nur einige Beobachtungen von CATCHESIDE (1938b) an *Zea mays* vor, die gleichfalls zeigen, daß Paare von Kontaktpunkten mit je 2 Brüchen häufiger sind als einzelne Kontaktpunkte mit 3 Brüchen. Die Angaben von DUBININ und KHVOSTOVA (1934) über Kontaktpunkte mit hoher Bruchzahl und die daraus abgeleitete „Knotenhypothese“ der Rekombination kann in diesem Zusammenhang nicht herangezogen werden, da es sich um nach ihrem komplizierten genetischen Verhalten besonders ausgesuchte Fälle handelt. Die Angaben von KIRSANOV sind ebenfalls nicht brauchbar, da er nur genetisch analysierte Translokationen behandelt, aus denen auf die Anzahl der Kontaktpunkte nicht geschlossen werden kann.

## VI. Allgemeine Ergebnisse und offene Fragen.

Aus der quadratischen Proportionalität der Kontaktpunkte und der sie zusammensetzenden Brüche und aus der Beobachtung, daß, wenn auch geringfügig, mit steigender Dosis die mittlere Bruchzahl der Kontaktpunkte zunimmt, wurde geschlossen, daß nicht die Rekombination als Änderungseinheit aufzufassen ist, sondern daß Einzeländerungen, Brüche, in den Chromosomen induziert werden, die sich später zu zweien oder mehreren kombinieren und erst so die Verlagerung ergeben. Diese Brüche müssen dann direkt proportional zur Dosis ausgelöst werden. Aus der Bruchverteilungskurve und aus den Befunden über die Rekombinationsbeschränkung ergab sich, daß nur ein Teil der angelegten Brüche realisiert wird, während ein anderer (größerer) rückgängig gemacht wird. Die Befunde sprechen alle für die Hypothese von STADLER. Dieser Schluß

wird wesentlich gestützt durch die Feststellung, daß die Größenordnung der Anzahl der Rekombinationsbereiche klein sein muß.

Die besondere Schwierigkeit, auf die von Physikern hingewiesen wurde<sup>1</sup>, liegt für die Bruchhypothese in der Annahme, daß die freien Enden, die durch den Bruch entstanden sind, sich wiederfinden. Während diese Schwierigkeit beim Spermienkern noch gering erscheint<sup>2</sup>, wird sie bei den nur locker von Chromosomen erfüllten Kernen typischer Ruheformen sehr groß. Eine allen anderen Bedingungen entsprechende Hypothese, die die von STADLER ersetzt, ist, wie bereits bei BAUER (1939a) kurz erwogen, die, daß nicht freie Brüche auftreten, sondern bruchfähige Stellen, die beim Zusammentreffen mit einer entsprechenden zu einer Rekombination führen.

Eine Entscheidung zwischen dieser und der STADLERSchen Hypothese ist einstweilen nicht möglich. Für die letztere sprechen die Beobachtungen über das Auftreten röntgeninduzierter Fragmente (SAX, 1938; CARLSON, 1938).

Daß freie Bruchenden im Gegensatz zu den Beobachtungen an röntgeninduzierten Brüchen unter anderen Bedingungen stabil werden können und so ihren wirklichen Nachweis gestatten, haben MCCLINTOCK (1939) und STADLER (Vortrag auf dem Internationalen Genetiker-Kongreß 1939) gezeigt. MCCLINTOCK konnte beweisen, daß Chromosomen, die in der Meiose mechanisch durchgetrennt worden sind, im Embryo eine in ihrer Natur unbekannte „Heilung“ der Bruchstelle erfahren, die sich dann weiterhin wie ein normales freies Ende verhält. STADLER teilte mit, daß die durch U-V-Bestrahlung ausgelösten Deficiencies terminale Lage haben, während interkalare nicht beobachtet worden sind. Auch hier ist also nach einfachem Bruch eine Stabilisierung der neuen Bruchenden des Chromosoms erfolgt.

Eine Wiedervereinigung mechanisch aufgetretener Brüche hat MCCLINTOCK (1938a, b) eindeutig bewiesen. Bizentrische Ringchromosomen, die in der Mitose von *Zea mays* bei der Anaphase an zwei Bruchstellen durchgetrennt werden, ergeben nie offene Chromosomen, die Enden vereinigen sich wieder. Bruchstellen, wie sie nach Durchtrennung einer durch Crossing-over entstandenen Inversionsbrücke auftreten, gehen nach Längsspaltung des Bruchchromosoms vor der nächsten Mitose eine Wiedervereinigung ein. Die primäre Bruchstelle ist in diesem Falle bei der Teilung des Chromosoms verdoppelt. Allerdings besteht hier (entsprechendes gilt wohl für die bizentrischen Ringe) die Schwierigkeit des Sichfindens der Bruchstellen nicht, da die durch Teilung verdoppelten Bruchenden unmittelbar aneinanderliegen<sup>3</sup>. Eine Beobachtung, die die

<sup>1</sup> Dr. BERNAL in mündlichen Besprechungen; JORDAN (1938).

<sup>2</sup> Auch nur so lange, wie die Rekombination im Spermienkopf selbst erfolgt.

<sup>3</sup> Für die Ringchromosomen beim Mais würde sich dieses aus Metaphaseplatten ergeben, in denen dann doch scheinbar offene Ringe zu sehen sein müßten.

Vereinigung getrennt aufgetretener Bruchstellen beweist, ist bisher nicht gemacht worden. Die Frage nach der Art des primären Einzelereignisses, ob freier Bruch oder „Aktivierung zur Rekombinationsfähigkeit“, ist also noch nicht entschieden.

Aus der Dosisbeziehung hatte sich ergeben, daß die primären Veränderungen durch einen Treffer bedingt werden. Die Natur dieses Trefferereignisses ist bisher so weit geklärt, daß, wie bei Genmutationen, eine Wellenlängenunabhängigkeit wenigstens in einigen Fällen bewiesen ist. Für die *ci*-Translokationen hat EBERHARDT diesen Nachweis geliefert, und MÜLLER (Vortrag auf dem Internationalen Genetiker-Kongreß 1939) gibt dasselbe allgemein für Translokationen an. Einige Versuche mit gleichem Ergebnis liegen auch für die zum Teil 1-Bruch-Mutationen darstellenden Ausfälle des  $X^c$ -Chromosoms vor (BAUER, 1939 b). In allen Fällen wurden sehr weiche Röntgenstrahlen (Grenzstrahlen) mit den üblichen mittlerer Härte verglichen. Diese Befunde machen es sehr wahrscheinlich, daß das Primärerreignis eine gleiche Änderung darstellt, wie sie in der Genmutation vorliegt (vgl. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, 1939 a).

Zu den Fragen nach dem sekundären Vorgang der Rekombination liegt bisher ein noch geringes und widerspruchsvolles Material vor. Rückschlüsse auf diesen Vorgang müssen einmal aus der cytologischen Analyse der Bruchkombinationen, wie sie oben durchgeführt worden ist, und andererseits aus experimentellen Untersuchungen über den Einfluß der Temperatur und des Zeitfaktors bei der Bestrahlung möglich sein.

Zwei Seiten des Rekombinationsprozesses müssen dabei berücksichtigt werden: die Zeitspanne, während der die primären Änderungen rekombinationsfähig sind, und die Bewegungsvorgänge, durch die zwei oder mehrere Bruchstellen in Kontakt geraten.

Über den Zeitpunkt liegen schon eine Reihe von Untersuchungen vor, die aber nicht widerspruchsfrei sind. SAX (1939) hat den Einfluß verdünnter und fraktionierter Bestrahlung bei *Tradescantia*-Mikrosporen untersucht und kommt zu dem Schluß, daß die induzierten Bruchenden im Durchschnitt nur etwa 1 Stunde lang Rekombinationen eingehen können, und daß sich danach die durch den Bruch getrennten Enden wieder in der ursprünglichen Anordnung miteinander vereinigen.

Aus seinen Ergebnissen über den Einfluß des Zeitfaktors bei *ci*-Translokationen kommt auch EBERHARDT (1939) zu dem Schluß, daß die induzierten Brüche nur für bestimmte Zeit rekombinationsfähig sind. Unter dieser Annahme läßt sich die Tatsache, daß mit der Verdünnung die Häufigkeit der Translokationen anfangs zunimmt, um erst sehr spät wieder geringer zu werden, so erklären, daß der Bruch bei  $ci^+$  länger seine Rekombinationsfähigkeit beibehält als der Durchschnitt aller Brüche.

Ebenso lassen sich die Ergebnisse von SAX und ENZMANN (1939) an *Tradescantia* und MICKY (1939) an *D. melanogaster* über den

Temperatureinfluß während der Bestrahlung formal auf Änderungen der Rekombinationszeit zurückführen; tiefe Temperaturen ergeben einen höheren Prozentsatz von Translokationen als höhere. Bei letzteren würde die Wiedervereinigung infolge der höheren Temperatur beschleunigt erfolgen, die Zahl der zur Rekombination zur Verfügung stehenden Brüche pro Zeiteinheit also relativ geringer sein.

Soweit lassen alle Untersuchungen sich gemeinsam dahin auslegen, daß die primären Änderungen (statt Brüche läßt sich in allen Fällen auch Anregungen zur Rekombinationsfähigkeit sagen) in relativ kurzer Zeit wieder abklingen.

Von anderen Beobachtungen her erwachsen dieser Deutung aber Schwierigkeiten. Zunächst hat ein Mitarbeiter MULLERs, SIDKY (erwähnt in MULLERs Vortrag auf dem Internationalen Genetiker-Kongreß, 1939) eine Translokation zwischen väterlichem und mütterlichem Chromosom beobachtet. Hier ist also die Rekombination zwischen einer röntgen-induzierten Bruchstelle in einem väterlichen Chromosom und einer anscheinend spontan aufgetretenen in einem mütterlichen Chromosom erst nach der Verschmelzung der Vorkerne eingetreten. Es muß die Zeitspanne zwischen Auftreten der primären Änderung und der Rekombination erheblich länger gewesen sein als nach den vorher besprochenen Untersuchungen. Die durch diesen Einzelfall nahegelegte Möglichkeit, daß die Rekombination erst nach Eintritt der mit der Befruchtung verbundenen Kernänderung erfolgt, wird durch die oben (S. 382) gemachten Ableitungen über den Rekombinationsbereich gestützt. Selbst wenn man mit dem unwahrscheinlichen Fall von 20 Rekombinationsbereichen rechnet, müßte immer noch mit Bewegungsvorgängen der Chromosomen im Spermakopf gerechnet werden, die in mikroskopische Dimensionen ( $0,3\mu$ ) hineinreichen. Bei der Organisation des Spermienkopfes (vgl. S. 367) ist eine derartige freie Verschiebbarkeit aber ganz unwahrscheinlich. Die wahrscheinliche Annahme von etwa 5–10 Rekombinationsbereichen läßt sich überhaupt nur verstehen, wenn die Rekombinationsvorgänge erst bei den Quellungsvorgängen einsetzen, die mit der Vorkernbildung verknüpft sind. Erst hier ist die Gelegenheit zu weitgehend freier Beweglichkeit der Chromosomen gegeben, die zu dem Kontakt verschiedener Bruchstellen führen kann.

Der Widerspruch, der zwischen dieser Deutung der aufgeschobenen Rekombination und der durch die experimentellen Befunde nahegelegten Auffassung beschränkter Rekombinationszeit besteht, kann erst nach weiteren Untersuchungen geklärt werden. Es ist klar, daß hierbei der Bau der bestrahlten Kerne besonders zu berücksichtigen ist. Normale Ruhekern, wie sie in den *Tradescantia*-Versuchen behandelt wurden, zeigen zweifellos im Zusammenhang mit der Entspiralisierung Bewegungs- und Stoffwechselprozesse anderer Art als die hochspezialisierten Spermien mit ihrem starren micellaren Kerngefüge. Die Schwierigkeiten, die für

die Annahme einer Verschiebbarkeit der Chromosomen bei letzteren vorliegen, brauchen für die Kerne von *Tradescantia* nicht zu bestehen. Der außerordentliche Einfluß des Kernbaues zeigt sich auch in den Versuchen von METZ und BOCHE (1939) an *Sciara*: nach Spermienbestrahlung traten Rekombinationen auf, während sie nach Oocytenbestrahlung vollständig fehlten. Dieser Versuchsausfall muß in erster Linie auf der im cytologischen Aufbau begründeten unterschiedlichen Lagebeziehung der Chromosomen zueinander begründet sein; denn die anderen Unterschiede —, die größere Strahlenempfindlichkeit der Oocyten und ihre Diploidie, die häufiger zu bizentrischen, in den Reifeteilungen eliminierten Verlagerungen führt — sollten nur graduelle Unterschiede hervorrufen. Hier bietet sich ein weites Feld für die künftigen Untersuchungen.

#### Zusammenfassung.

Die cytologische Untersuchung der Speicheldrüsen von 3404 weiblichen  $F_1$ -Larven nach Röntgenbestrahlung der P- $\sigma\sigma$  hat folgendes ergeben:

1. Für Kontaktpunkte und die sie zusammensetzenden Einzelbrüche wurde eine quadratische Dosisproportionalität festgestellt. Mit steigender Dosis nimmt die Zahl der sich an einem Kontaktpunkt beteiligenden Brüche zu. Kontaktpunkte sind also nur sekundäre Mutations-einheiten. Als primäre Ereignisse treten Einzelbrüche oder unilokale Änderungen auf, die zu späterer Rekombination befähigt sind. Diese werden durch einen Treffer ausgelöst.

2. Die Anzahl der realisierten Einzelbrüche nimmt innerhalb der Chromosomenschenkel vom distalen Ende proximalwärts anfangs schnell, dann langsam ab. Die Bruchhäufigkeit der freien Enden ist etwa doppelt so hoch, wie die der spindelansatznahen Abschnitte.

3. Aus der Lageverteilung der sich in einem Kontaktpunkt kombinierenden Brüche längs den Chromosomen ist auf eine zufallsgemäße Orientierung der Chromosomenabschnitte zueinander zu schließen. Inversionen und reziproke Translokationen sowie 3-Bruch-Mutationen zeigen einen Abstand ihrer Bruchstellen, die einer Zufallsverteilung der Einzelbrüche entspricht. Die Ursache hierfür ist in der zufallsgemäßen Anordnung der Chromosomen im Spermienkopf zu erblicken.

4. Die einzelnen Chromosomenschenkel beteiligen sich an 2-Bruch-Verlagerungen nicht dem Zufall entsprechend. Das Verhältnis von reziproken Translokationen zu Inversionen (2:1) ist bei einer Beteiligung von nur 3 Schenkeln zu erwarten. Es ist also die Rekombination auf Bereiche beschränkt, die durch das Zusammenliegen von 3 Chromosomenschenkel begrenzt wird. Die Ursache hierfür muß in der geringen Bewegungsfreiheit der Bruchstellen liegen. Bei Kontaktpunkten mit mehr als 2 Brüchen entspricht die Beteiligung der Chromosomenschenkel dagegen der Erwartung.



5. Die Rekombinationsbeschränkung äußert sich bei 4-Bruch-Fällen weiter darin, daß diese 4 Brüche häufiger 2 als einen Kontaktpunkt bilden. Aus dem Verhältnis beider Klassen läßt sich unter Berücksichtigung der 2- und 3-Bruch-Fälle zeigen, daß die Anzahl der Rekombinationsbereiche niedrig sein muß.

6. Die sich aus diesen Beobachtungen und den bisherigen Veröffentlichungen ergebenden Widersprüche über den zeitlichen und räumlichen Ablauf des Rekombinationsvorganges werden erörtert.

#### Schriftenverzeichnis.

- Bauer, H.: Cytogenetik. Fortschr. Zool., N.F. 2, 547—570 (1937). — Die Chromosomenmutationen. Z. Abstammungslehre 76, 309—322 (1939a). — Die Dosisaabhängigkeit röntgeninduzierter Chromosomenmutationen im Ring-X-Chromosom von *Drosophila melanogaster*. Naturwiss. 27, 821—822 (1936b). — Bauer, H., M. Demerec and B. P. Kaufmann: X-ray induced chromosomal alterations in *Drosophila melanogaster*. Genetics 23, 610—630 (1938). — Bauer, H. u. N. W. Timoféeff-Ressovsky: Vererbung und Vererbungscytologie von *Drosophila* im Schulversuch. Biologie 8, 324—335 (1939). — Belgovsky, M.: Dependence of translocation frequency in *Drosophila* upon the X-ray dosage. Bull. Inst. Genetics Acad. Sci. USSR. 11, 93—124 (1937). — Bridges, C. B.: Salivary chromosome maps. J. Hered. 26, 60—64 (1935). — A revised map of the salivary gland X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. J. Hered. 29, 11—13 (1938). — Carlson, J. G.: Some effects of X-radiation on the neuroblast chromosomes of the grasshopper, *Chortophaga viridifasciata*. Genetics 23, 596—609 (1938). Catchside, D. G.: The effect of X-ray dosage upon the frequency of induced structural changes in the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. J. Genetics 36, 307—320 (1938). — The bearing of the frequencies of X-ray induced interchanges in maize upon the mechanism of their induction. J. Genetics 36, 321—328 (1938). — Demerec, M. and B. P. Kaufmann: The gene. Carnegie Inst. Year Book 37 (1938). — Dubinin, N. P. and V. V. Khvostova: The mechanism of the occurrence of complex chromosome rearrangements. Biol. Ž. (russ.) 4, 967 bis 975 (1935). — Eberhardt, K.: Über den Mechanismus strahleninduzierter Chromosomenmutationen bei *Drosophila melanogaster*. Chromosoma 1, 317—335 (1939). — Gowen, J. W. and E. H. Gay: Gene number, kind, and size in *Drosophila*. Genetics 18, 1—31 (1933). — Heitz, E.: Die Herkunft der Chromocentren. Planta (Berl.) 18, 571—636 (1932). — Jordan, P.: Über den Mechanismus der Chromosomenmutationen. Naturwiss. 26, 839 (1938). — Kaufmann, B. P. and M. Demerec: Frequency of induced breaks in chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 23, 484—488 (1937). — Khvostova, V. V. and A. A. Gavrilova: A new method for discovering translocations. Biol. Ž. (russ.) 4, 915—916 (1935). — Relation between the number of translocations in *Drosophila* and the dosages of X-rays. Biol. Ž. (russ.) 7 (1938). — Kirssanov, B. A.: Der Entstehungsmechanismus der Translokationen bei *Drosophila melanogaster*. Biol. Ž. (russ.) 6, 899—906 (1937). — Levitsky, G. u. M. Sizova: Further studies on regularities in chromosome transformations in *Crepis capillaris* induced by X-rays. C. r. Acad. Sci. USSR. 4, 70, 71 (1935). — McClintock, B.: The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. Genetics 23, 315—376 (1938a). — The fusion of broken ends of sister half-chromatids following chromatid breakage at meiotic anaphases. Agricult. exper. Stat. Res. Bull. 290, 1—48 (1938). — The behavior in successive

- nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 25, 405—416 (1939). — Metz, C. W. and R. D. Boche: Observations on the mechanism of induced chromosome rearrangements in *Sciara*. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 25, 280—284 (1939). — Mickey, G. H.: The influence of low temperature on the frequency of translocations produced by X-rays in *Drosophila melanogaster*. Genetica 21, 386—407 (1939). — Morgan, T. H., C. B. Bridges and J. Schultz: Constitution of the germinal material in relation to heredity. Carnegie Inst. Year Book 36, 298—305 (1937). — Muller H. J.: The problem of genic modification. Z. Abstammungslehre Suppl. 1, 234—260 (1928). — The remaking of chromosomes. Collect. Net 13, 181—198 (1938). — Muller, H. J. and E. Altenburg: The frequency of translocations produced by X-rays in *Drosophila*. Genetics 15, 283—311 (1930). — Muller, H. J., A. I. Makki and A. R. Sidky: Gene rearrangement in relation to radiation dosage. J. Genet. 37 (1939). — Oliver, C. P.: Chromosomal aberrations and X-ray dosage. Anat. Rec. 51, 110 (1931). — Patterson, J. T., W. Stone, S. Bedichek and M. Suche: The production of translocations in *Drosophila*. Amer. Naturalist 68, 359—369 (1934). — Pattri, H. O. E.: Über die Doppelbrechung der Spermien. Z. Zellforsch. 16, 723—744 (1923). — Prokofieva-Belgovskaya, A. A.: Cytological mechanism of mosaicism and of chromosome rearrangement. C. r. Acad. Sci. USSR. 22, 270—273 (1939a). — Prokofieva-Belgovskaya, A. A. and V. V. Khvostova: Distribution of breaks in the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. C. r. Acad. Sci. USSR. 23, 270—272 (1939b). — Sax, K.: Chromosome aberrations induced by X-rays. Genetics 23, 494—516 (1938). — The time factor in X-ray production of chromosome aberrations. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 25, 225—233 (1939). — Sax, K. and E. V. Enzmann: The effect of temperature on X-ray induced chromosome aberrations. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 25, 397—405 (1939). — Sax, K. and K. Mather: An X-ray analysis of progressive chromosome splitting. J. Genet. 37, 483—490 (1939). — Schmidt, W. J.: Der submikroskopische Bau des Chromatins. I. Mitt. Über die Doppelbrechung des Spermienkopfes. Zool. Jb., Physiol. 45, 177—216 (1928). — Serebrovsky, A. S.: A general scheme for the origin of mutations. Amer. Naturalist 63, 374—378 (1929). — Stadler, L. J.: Genetic effects of X-rays in maize. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 14, 69—75 (1928). — On the genetic nature of induced mutations in plants. Proc. VI. internat. Congr. Genetics 1, 274—294 (1932). — Timoféeff-Ressovsky, N. W.: Le mécanisme des mutations et la structure du gène. Paris: Hermann 1939a. — Zur Frage der Beziehungen zwischen strahlenausgelösten Punkt- und Chromosomenmutationen bei *Drosophila*. Chromosoma 1, 310—316 (1939b). — Timoféeff-Ressovsky, N. W. u. M. Delbrück: Strahlengenetische Versuche über sichtbare Mutationen und die Mutabilität einzelner Gene bei *Drosophila*. Z. Abstammungslehre 71, 322—334 (1936). — Wolf, E.: Die Anordnung der Chromosomen im Spermienkern von *Dicranomyia trinitata* Meig. Chromosoma 1, 336—342 (1939).

